

THIS PAGE IS INSERTED BY OIPE SCANNING

IMAGES WITHIN THIS DOCUMENT ARE BEST AVAILABLE COPY AND CONTAIN DEFECTIVE IMAGES SCANNED FROM ORIGINALS SUBMITTED BY THE APPLICANT.

DEFECTIVE IMAGES COULD INCLUDE BUT ARE NOT LIMITED TO:

BLACK BORDERS

TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT

ILLEGIBLE TEXT

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED PHOTOS

BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS

GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
RESCANNING DOCUMENTS *WILL NOT*
CORRECT IMAGES.**

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. : To Be Determined Confirmation No. :
Applicant : Eberhard WEIHE, et al.
Filed : March 24, 2004
TC/A.U. : To Be Determined
Examiner : To Be Determined
Docket No. : 029310.53352US
Customer No. : 23911
Title : Screening Method for Various Indications Using BNPI
and/or DNPI

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Mail Stop Patent Application

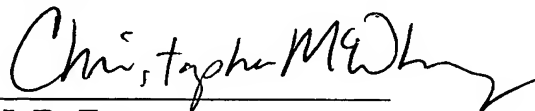
Director of the USPTO
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of prior foreign application Nos. DE 101 47 006.1 filed September 24, 2001, and DE 101 47 028.2 filed September 25, 2001, both filed in the Federal Republic of Germany, is hereby requested and the right of priority under 35 U.S.C. §119 is hereby claimed.

In support of this claim, duly certified copies of these foreign applications are submitted herewith.

Respectfully submitted,



J. D. Evans

Registration No. 26,269

Christopher T. McWhinney

Registration No. 42,875

Date: March 24, 2004

CROWELL & MORING LLP
Intellectual Property Group
P.O. Box 14300
Washington, DC 20044-4300
Telephone No.: (202) 624-2500
Facsimile No.: (202) 628-8844



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 47 028.2

Anmeldetag: 25. September 2001

Anmelder/Inhaber: Grünenthal GmbH,
Aachen/DE

Bezeichnung: Screeningverfahren für verschiedene
Indikationen mit BNPI und/oder DNPI

IPC: C 12 Q 1/25

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stark

Patentanmeldung der Grünenthal GmbH, D-52078 Aachen
(eigenes Zeichen: GRA 3089)

Screeningverfahren für verschiedene Indikationen mit BNPI und/oder
DNPI

5

10

15

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung pharmazeutisch wirksamer Substanzen unter Verwendung von BNPI und/oder DNPI bzw. davon abgeleiteter Biomoleküle und die Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen, an BNPI und/oder DNPI bindender Wirkstoffe, gegen BNPI und/oder DNPI gerichteter Antikörper, von Antisensenukleotiden gegen BNPI und/oder DNPI, oder von BNPI und/oder DNPI bzw. Teilproteinen davon, bzw. entsprechenden Polynukleotiden zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung verschiedener Erkrankungen oder zu Therapie und Diagnostik.

20

25

30

Das Auffinden der Angriffsorte pharmazeutischer Wirkstoffe, der sogenannten „Targets“ ist eine der wichtigsten Aufgaben moderner Pharmaforschung. Über die Affinitäten an diesen Targets oder auch über die durch eine Wechselwirkung mit diesen Targets ausgelösten physiologischen Effekte lassen sich über sogenannte „Screeningverfahren“ aus der Vielzahl von bekannter Substanzen, beispielsweise aus den Substanzbibliotheken der pharmazeutischen Forschung, interessante Substanzen oder Substanzklassen herausfiltern, die in den mit diesem Target assoziierten Indikationen mit hoher Wahrscheinlichkeit wirksam sind. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Targets gehören Proteine, im allgemeinen Rezeptoren, insbesondere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, und Transportproteine. Die Auffindung dieser Targets gestaltet sich aber teilweise sehr schwierig, da die potentielle Auswahl sehr groß ist. Zur Orientierung und Identifizierung dienen zum einen Erkenntnisse über die (physiologische) Funktion mit der (potentiellen) Position in Signalkaskaden und Stoffwechselwegen zum anderen aber auch Lokalisation und

Expressionsgrad in den verschiedenen Geweben. Im Rahmen dieser Erfindung wurde dabei ein besonderes Augenmerk auf das zentrale Nervensystem gerichtet, wo es nicht nur auf eine generelle Lokalisation sondern auf eine sehr spezifische und präzise Verteilung in den verschiedensten Regionen ankommt.

Aufgabe der Erfindung war daher die Auffindung und Identifizierung eines oder mehrerer derartiger Targets, insbesondere mit zentralnervöser Lokalisation und Wirksamkeit, und die Entwicklung eines entsprechenden Screeningverfahrens. Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Auffindung pharmazeutisch relevanter Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur Behandlung von

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration

insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie;
 Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung,
 Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung
 insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom,
 5 Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums,
 cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen
 des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder
 Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder
 Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des
 10 Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless
 Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen;
 Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol,
 Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit
 Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne
 15 Alkoholintoxikation, neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen,
 Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien,
 Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen,
 alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation,
 Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress,
 20 Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-
 Restaurant-Syndrom, Aggression, Paranoia, Hirnerschütterung,
 neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre
 Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale
 Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death
 25 (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie,
 multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie
 Impotenz oder Priapismus oder mit Wirksamkeit zur Förderung der
 Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der Kognition oder des
 Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur Liquordiagnostik
 30 neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten Therapie per
 Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

mit folgenden Verfahrensschritten:

- 5 (a) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten Bedingungen mit mindestens einem Biomolekül aus Gruppe I: dem Protein BNPI und/oder DNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder deren Antisense Polynukleotide bindet, oder 10 einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens eines der vorgenannten Proteine und Teilproteine, bzw. Biomoleküle, synthetisiert hat, 20
- (b) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem oder den von der Zelle synthetisierten Protein/en und/oder Teilprotein/en oder Messung mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz an das oder die Protein/e und/oder Teilprotein/e, bzw. Biomolekül/e veränderten funktionellen Parameter. 25

Dieses neue Screeningverfahren basiert darauf, daß hier eine potentielle medizinische Wirksamkeit einer Substanz über ihre Wechselwirkung mit mindestens einer physiologisch relevanten Protein- oder Peptidstruktur, einem Target, BNPI und/oder DNPI oder verwandten Strukturen, 30 aufgefunden werden kann. BNPI und DNPI bzw. die davon abgeleiteten hier aufgezählten Proteine und Teilproteine bzw. Peptide oder für diese

5 kodierenden Nukleinsäuren wurden im Rahmen dieser Erfindung als
interessante Targets identifiziert. Dabei zeigten BNPI und DNPI eine
Lokalisation in den unterschiedlichsten ZNS-Bereichen, aber
überraschenderweise - trotz teilweise engster Nachbarschaft - auch eine
10 stets streng getrennte Lokalisation, wobei gerade diese strenge Trennung
deutlich darauf hindeutet, daß über DNPI und BNPI wichtige
physiologische Prozesse gesteuert werden. Da DNPI und BNPI auch in
therapeutisch sehr interessanten Bereichen des ZNS lokalisiert sind und
daher für eine entsprechende Vielzahl von Indikationen von Interesse sind,
15 sind DNPI und BNPI entsprechend wichtige Targets, mit denen
Screeningverfahren auf pharmakologisch wirksame Verbindungen
durchgeführt werden können. Folglich ist auch bevorzugt, wenn in einem
Screeningverfahren gleichzeitig BNPI und DNPI bzw. jeweils eines der
davon abgeleiteten hier aufgezählten Proteine und Teilproteine bzw.
20 Peptide oder eine für diese kodierende Nukleinsäure eingesetzt werden,
oder das Ergebniss zweier getrennter Screeningverfahren einmal mit BNPI
bzw. einem der davon abgeleiteten hier aufgezählten Proteine und
Teilproteine bzw. Peptide oder einer für diese kodierenden Nukleinsäure
und einmal mit DNPI bzw. einem der davon abgeleiteten hier aufgezählten
25 Proteine und Teilproteine bzw. Peptide oder einer für diese kodierenden
Nukleinsäure durchgeführt werden und in beiden Fällen durch
differentiellen Abgleich der Daten optimiert pharmakologisch wirksame
Substanzen identifiziert werden.

30 Dabei bezieht sich die Begriffe pharmazeutisch relevant oder
pharmakologisch wirksam auf einen potentiell heilenden oder lindernden
Einfluß der Substanz auf bestimmte Krankheitsbilder. Der Begriff Substanz
umfaßt jede als Arzneimittel-Wirkstoff geeignete Verbindung, insbesondere
also niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch andere wie Nukleinsäuren,
Fette, Zucker, Peptide oder Proteine wie Antikörper.

Die Inkubation unter geeigneten Bedingungen ist hier so zu verstehen, daß die zu untersuchende Substanz mit der Zelle oder der entsprechenden Präparation in einem wässrigen Medium eine definierte Zeit vor der Messung reagieren kann. Dabei kann das wässrige Medium temperiert werden, beispielsweise zwischen 4°C und 40°C, vorzugsweise bei Raumtemperatur oder bei 37°C. Die Inkubationszeit kann zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden variiert werden, je nach der Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Bevorzugt sind aber Zeiten zwischen 1 min und 60 min. Das wässrige Medium kann geeignete Salze und/oder Puffersysteme enthalten, so daß bei der Inkubation beispielsweise ein pH zwischen 6 und 8, vorzugsweise pH 7,0 - 7,5 im Medium herrscht. Dem Medium können weiter geeignete Substanzen, wie Coenzyme, Nährstoffe etc. beigefügt werden. Die geeigneten Bedingungen können vom Fachmann in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein aufgrund seiner Erfahrung, der Literatur oder weniger, einfacher Vorversuche leicht festgelegt werden, um im Verfahren einen möglichst deutlichen Meßwert zu erhalten.

Eine Zelle, die ein bestimmtes Teilprotein oder Protein synthetisiert hat, ist eine Zelle, die dieses Teilprotein oder Protein bereits endogen exprimiert hat oder eine solche, die gentechnisch verändert wurden, so daß sie dieses Teilprotein oder Protein exprimiert und entsprechend vor Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens das Teilprotein oder Protein enthält.

Die Zellen können Zellen aus evt. immortalisierten Zelllinien sein oder native aus Geweben stammende und aus diesen isolierte Zellen sein, wobei der Zellverband meist aufgelöst ist. Die Präparation aus diesen Zellen umfaßt insbesondere Homogenate aus den Zellen, das Cytosol, eine Membranfraktion der Zellen mit Membranfragmenten, eine Suspension isolierter Zellorganellen etc.

Aus welcher Spezies diese Proteine stammen, ist für die Funktion des Verfahrens unerheblich, es ist aber bevorzugt, die humane, Maus- oder Ratten-Variante zu verwenden. BNPI und DNPI sind in Hinblick auf die kodierende DNA- und die Aminosäure-Sequenz bekannt und auch in ihrer generellen Funktion beschrieben. BNPI, der „brain Na⁺ dependent inorganic phosphate cotransporter“ ist in der WO 96/34288 beschrieben und der DNPI, der „differentiation-associated Na⁺ dependent inorganic phosphate Cotransporter“, wurde von Aihara et al. (2000) im J. Neurochem. 74, 2622-2625 beschrieben. Neben der Funktion als natriumabhängigen Phosphattransporter wurde für BNPI auch eine Funktion als vesikulärer Glutamat-Transporter beschrieben und BNPI als VGlutT1 bezeichnet (Bellocchio et al. (2000), Science 189:957-960; Takamori et al. (2000), Nature 407; 189-194).

Der Maßstab, über den das Verfahren die Auffindung interessanter Substanzen erlaubt, ist entweder die Bindung an das Biomolekül, das Protein oder Teilprotein, die z.B. durch Verdrängung eines bekannten Liganden oder das Ausmaß gebundener Substanz nachgewiesen werden kann, oder die Veränderung eines funktionellen Parameters durch die Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Diese Wechselwirkung kann insbesondere in einer Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen liegen und veränderte funktionelle Parameter können beispielsweise die Genexpression, das Ionenmilieu, der pH oder das Membranpotentials, bzw. die Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger sein.

Zur Erläuterung der Erfindung werden im folgenden neben den im allgemeinen Text zu Begriffen gegebenen Erklärungen weitere Definitionen angegeben, um klarzustellen, wie bestimmte, insbesondere in den Ansprüchen verwendete Begriffe im Sinne dieser Erfindung zu verstehen und auszulegen sind.

- 5 - Substanz: Damit ist eine chemische Verbindung gemeint. Hier handelt es sich im engeren Sinne um Verbindungen, die potentiell eine Wirkung im Körper entfalten können, niedermolekulare Wirkstoffe, Nukleinsäuren, Fette, Zucker, Peptide oder Proteine, insbesondere hier niedermolekulare Wirkstoffe.
- 10 - pharmazeutisch relevante Substanz: Im Sinne der Erfindung ist eine pharmazeutisch relevante Substanz eine Substanz, die über die Bindung an die Biomoleküle der Gruppen I bis III in wenigstens einer der genannten Indikationen wirksam sein könnte und theoretisch das Potential besitzt, physiologisch die Symptome direkt oder indirekt zu beeinflussen, insbesondere so erscheint, als könne sie therapeutisch, beispielsweise in einem Arzneimittel, eingesetzt werden.
- 15 - schmerzregulierend: Im Sinne der Erfindung heißt schmerzregulierend, daß die Substanz die Wahrnehmung von Schmerz direkt oder indirekt beeinflußt, insbesondere natürlich analgetisch wirkt.
- 20 - Schmerz: Im Sinne der Erfindung bedeutet Schmerz insbesondere ein Schmerzempfinden, präziser akuter, chronischer, neuropathischer und entzündlicher Schmerz inclusive Migräne, insbesondere ist der Schmerz zugehörig zu folgenden Arten:

25 chronischem Schmerz, insbesondere muskuloskelettalem Schmerz; neuropathischem Schmerz, insbesondere allodynischem Schmerz, mechanischer Hyperalgesie oder diabetischer Neuropathie; viszeralem Schmerz, cerebralem Schmerz, peripherem Schmerz oder entzündungsbedingtem Schmerz, insbesondere peripherem Entzündungsschmerz; sowie

30 Migräne, Cluster-Kopfschmerz oder den Schmerz bei Trigeminus Neuralgie.

- Inkubation: Unter Inkubation ist das Einbringen und Belassen eines biologischen Untersuchungsobjektes, beispielsweise einer Zelle oder eines Proteins, in einem temperierten Medium wie in einem Brutschrank oder auf einem Wasserbad zu verstehen. Dabei heißt hier unter geeigneten Bedingungen eine Inkubation unter physiologischen Bedingungen (z.B. 37°C pH7,2) oder bei den Bedingungen, bei denen eine optimale Messung im Verfahren möglich wird.
- Zelle: Die Zelle ist ein sich selbst regulierendes, offenes, mit seiner Umgebung durch permanenten Stoffaustausch in einem Fließgleichgewicht stehendes System mit eigenem Stoffwechsel, und Vermehrungsfähigkeit. Die Zelle kann separat kultiviert oder Teil eines Gewebes, insbesondere aus einem Organ, sein, und dort vereinzelt oder noch im Zellverband vorliegen.
- Präparation aus einer Zelle: Darunter versteht man Präparate, die mittels chemischer, biologischer, mechanischer oder physikalischer Methoden unter Änderung der Zellstruktur hergestellt werden, beispielsweise Membranfragmente, isolierte Zellkompartimente, isoliertes Cytosol, oder aus Gewebe gewonnenes Homogenat.
- Peptid: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften Aminosäuren. Ein Oligopeptid besteht aus zwischen 2 und 9 Aminosäuren, ein Polypeptid aus zwischen 10 und 100 Aminosäuren.
- Protein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 100 Aminosäuren u.U. mit einer definierten Raumstruktur.
- Teilprotein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 10 Aminosäuren u.U. mit einer definierten

Raumstruktur aber ausgeschnitten bzw. ausgewählt aus einem definierten Protein. Ein Teilprotein kann ein Peptid sein.

- 5 - PIM1-Kinase; PIM3-Kinase: Ein Proto-Oncogen und eine Serin-Threonin-Kinase.

- 10 - Polynukleotid: Das zugrundeliegende Nukleotid ist ein grundsätzlich aus Nucleinbase, Pentose und Phosphorsäure bestehender Grundbaustein der Nucleinsäuren. Diese entspricht einem hochmolekularen Polynucleotid aus mehreren Nukleotiden, die über Phosphorsäure-Pentose-Veresterung miteinander verknüpft sind. Unter dieser Erfindung fallen aber auch modifizierte Polynukleotide, die zwar die Basenabfolge beibehalten, aber über ein modifiziertes Rückgrat statt der Phosphorsäure-Pentose verfügen.

- 15 - zu mindestens 90 (95, 97)% ähnlich: Darunter ist zu verstehen, daß die mit erfaßten Polynucleotide in ihrem kodierenden Bereich bezüglich der Basenabfolge zu mindestens 90% (95%, 97%) identisch mit der Referenz (Abbildung etc.) sind und die mit erfaßten Peptide und
- 20 Proteine in ihrer Primärstruktur, der Abfolge der Aminosäuren zu mindestens 90% (95%, 97%) mit der Referenz identisch sind.

- 25 - Gen: Mit dem Begriff Gen wird ein Genomabschnitt mit einer definierten Nukleotidsequenz bezeichnet, der die Information zur Synthese einer m- oder prä-mRNA oder einer sonstigen RNA (z.B. tRNA, rRNA, snRNA etc.) enthält. Es besteht aus kodierenden und nicht kodierenden Abschnitten.

- 30 - Genfragment: Nukleinsäureabschnitt, der in seiner Basenabfolge einen Teilbereich eines Gens beinhaltet

- Biomolekül: Allgemeiner Begriff für Nukleinsäuren oder Polyaminosäuren, insbesondere auch DNA, RNA, Peptide (Teilproteine) und Proteine, wobei diese Moleküle auch künstlich verändert sein dürfen. Im Sinne dieser Erfindung vorzugsweise Peptide (Teilproteine) und Proteine.
- Bindung an das Peptid, Teilprotein oder Protein: Wechselwirkung zwischen Substanz und Peptid, Teilprotein oder Protein, die zu Fixierung führt.
- funktionelle Parameter: darunter versteht man Meßgrößen eines Experimentes, die mit der Funktion eines Proteins (Ionenkanal, Rezeptor, Enzym) korrelieren
- gentechnisch manipuliert: Manipulation von Zellen, Geweben oder Organismen derart, daß hier genetisches Material eingebracht wird
- endogen exprimiert: Expression eines Proteins, die eine Zelllinie unter geeigneten Kulturbedingungen aufweist, ohne das dieses entsprechende Protein durch gentechnische Manipulation zur Expression veranlasst wurde
- G-Protein: International übliche Abkürzung für ein Gunaosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein, das als Signalprotein durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird
- Reporteragen: Generelle Bezeichnung für Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer Methoden oder histochemischer Methoden einfach nachweisen lassen, wie z.B. Luziferase, alkalische Phosphatase oder Green Fluorescent Protein (GFP).

- (rekombinantes) DNA-Konstrukt: Generelle Bezeichnung für jede Art von DNA-Molekülen, die durch die in vitro-Verknüpfung von DNA-Molekülen entstanden sind.
- 5 - Klonierungsvektor: Generelle Bezeichnung für Nukleinsäure-Moleküle, die beim Klonieren als Träger von Fremdgenen oder Teilen dieser Gene dienen.
- 10 - Expressionsvektor: Bezeichnung für speziell konstruierte Klonierungsvektoren, die nach Einbringen in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in den Vektor einklonierten Fremdgens erlauben.
- 15 - LTR-Sequenz: Abkürzung für Long terminal repeat. Generelle Bezeichnung für längere Sequenzbereiche, die an beiden Enden eines linearen Genoms zu finden sind. Derartige Sequenzbereiche kommen z.B. in den Genomen von Retroviren und an den Enden eukaryontischer Transposons vor.
- 20 - Poly-A-Schwanz: die am 3'-Ende von messenger-RNAs durch Polyadenylierung angehefteten Adenyl-Reste (ca. 20-250).
- 25 - Promotor-Sequenz: Bezeichnung für einen DNA-Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens, d.h. die Synthese der mRNA, gesteuert wird.
- 30 - ORI-Sequenz: Abkürzung für Origin of replication. Die ORI-Sequenz erlaubt einem DNA-Molekül, sich als autonome Einheit in der Zelle zu vermehren.

- Enhancer-Sequenz: Bezeichnung für relativ kurze, zum Teil als Repetitionen auftretende, genetische Elemente, die in der Regel die Expression mancher Gene in unterschiedlichem Maße verstärken.
- 5 - Transkriptionsfaktor: Bezeichnung für ein Protein, das über eine Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, die Transkription eines Gens beeinflusst.
- kultivieren: Zellen oder Gewebe unter geeigneten Kulturbedingungen halten
- 10 - Bedingungen, die eine Expression erlauben, darunter versteht man die Auswahl und Anwendung von Kulturbedingungen die eine Expression des interessierenden Proteins erlauben, darunter gehören Temperaturänderung, Mediumwechsel, Zusatz von induzierenden Substanzen, Weglassen hemmender Substanzen.
- 15 - Inkubationszeit: Zeitdauer für die Zellen oder Gewebe inkubiert, d.h. einer definierten Temperatur ausgesetzt werden.
- 20 - Selektionsdruck: Anwendungen von Kulturbedingungen die Zellen mit einem bestimmtem Genprodukt, dem sog. Selektionsmarker, einen Wachstumsvorteil verschaffen.
- 25 - Amphibienzelle, Zelle aus einem Tier der Klasse der Amphibia
- Bakterienzelle, Zelle die dem Überreich der Eubacteria oder Archaeobacteria zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- 30 - Hefezelle, Zelle die der Ordnung der Endomycetalse zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.

- Insektenzelle, Zelle die der Ordnung der Hexapoda zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- 5 - native Säugetierzelle, aus einem Säugetier stammende Zelle, die in ihren relevanten Merkmalen der im Organismus befindlichen Zelle entspricht.
- 10 - immortalisierte Säugetierzelle: Zelle die durch die angewendeten Kulturbedingungen oder gentechnische Manipulation die Eigenschaft erlangt hat, sich über die normalerweise übliche Teilungshäufigkeit hinaus (ca.100) in der Kultur zu teilen.
- 15 - markiert: durch entsprechende Modifizierung oder Derivatisierung für eine Nachweisreaktion zugänglich gemacht. Beispielsweise radioaktiv, fluoreszierend oder lumineszierend.
- Ligand: Substanz, die an ein im Körper oder einer Zelle befindliches Molekül, im speziellen einen Rezeptor, bindet
- 20 - Verdrängung: vollständiges oder partielles Entfernen eines Liganden von seiner Bindungsstelle
- gebundene Aktivität: Biochemisch oder physikalisch erfaßter Meßwert, der mit der an einem Rezeptor gebundenen Ligandenmenge korreliert
- 25 - Regulation: die als Teil eines Regelprozesse erfolgte Hemmung oder Aktivierung eines Vorgangs
- Hemmung: als Sonderfall der Regulation die Verhinderung/Minderung eines Vorgangs
- 30

- Aktivierung: als Sonderfall der Regulation die Verstärkung eines Vorgangs
- Rezeptoren: Im weitesten Sinne alle im pro- oder eukaryoten Organismus vorhandenen Moleküle, an die ein Wirkstoff binden kann. Im engeren Sinne membrangebundene Proteine oder Komplexe mehrerer Proteine, die durch Bindung eines Wirkstoffes eine Änderung in der Zelle hervorrufen.
- Ionenkanäle: Membrangebundene Proteine oder Komplexe mehrerer Proteine, durch die Kationen oder Anionen durch die Membran hindurchgelangen können.
- Enzyme: Bezeichnung für Proteine oder Komplexe aus einer aktivierenden Nichteiweißkomponente mit einem Protein, die katalytische Eigenschaften besitzen.
- Genexpression (exprimieren/exprimierbar): das Übersetzen der genetischen Information eines Genes in RNA (RNA-Expression) oder in Protein (Proteinexpression).
- Ionenmilieu: Ionenkonzentration eines oder mehrerer Ionen in einem bestimmten Kompartiment.
- Membranpotential: Spannungsdifferenz über eine Membran aufgrund eines Überschusses an Kationen auf der einen Seite und Anionen auf der anderen Seite der Membran.
- Veränderung der Enzymaktivität: Hemmung oder Induktion der katalytischen Aktivität eines Enzyms.

- 2nd messenger: kleines Molekül, das als Antwort auf ein extrazelluläres Signal entweder im Cytosol gebildet wird oder in das Cytosol hineinwandert und dabei hilft die Information an das Zellinnere weiterzugeben, wie zum Beispiel cAMP, IP₃.

5

- (Gen-)Sonde: Bezeichnung für jede Art von Nukleinsäuren, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte DNA-Sequenz nachweisen kann. Durch Derivatisierung der Gensonde (z.B. Biotin, magnetische Beads, Digoxinin) können zudem DNA-Moleküle aus einem Gemisch herausgezogen werden. Als Sonden werden klonierte Gene, Genfragmente, chemisch synthetisierte Oligonukleotide und auch RNA verwendet, die meist radioaktiv markiert ist.

10

- DNA: Internationale Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure

15

- genomische DNA: Generelle Bezeichnung für die bei eukaryontischen Organismen aus dem Zellkern einer Zelle stammenden DNA.

- cDNA: Abkürzung für complementary DNA. Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls.

20

- cDNA-Bank/Bibliothek: Bezeichnung für eine Sammlung von willkürlich klonierten cDNA-Fragmenten, die zusammengekommen die Gesamtheit aller von einer Zelle oder einem Gewebe synthetisierten RNA repräsentieren.

25

- cDNA-Klon: Bezeichnung für eine Population genetisch einheitlicher Zellen, die sich von einer einzigen Zelle ableiten, derart, daß diese Zelle eine künstlich eingebrachtes cDNA-Fragment enthält.

30

- Hybridisierung: Durch Basenpaarung bewirkte Ausbildung eines doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküls aus zwei getrennten Einzelsträngen.
- 5 - stringente Bedingungen: Bedingungen, unter denen nur perfekt basengepaarte Nukleinsäure-Stränge gebildet werden und stabil bleiben.
- 10 - isolieren: ein gesuchtes Molekül aus einem Gemisch herausfinden und abtrennen.
- DNA-Sequenzierung: Bestimmung der Abfolge der von Basen in einem DNA-Molekül.
- 15 - Nukleinsäuresequenz: Bezeichnung für die Primärstruktur eines DNA-Moleküls, d.h. die Abfolge der einzelnen Basen, aus denen sich eine DNA zusammensetzt.
- 20 - Genspezifische Oligonukleotid Primer: Oligonukleinsäuren, also 10-40 Basen lange Nukleinsäurefragmente, die in ihrer Basenzusammensetzung eine stringente Hybridisierung an das gesuchte Gen oder die gesuchte cDNA erlauben.
- 25 - Ermitteln von Oligonukleotid Primern: Die manuelle oder Computerunterstützte Suche von Oligonukleotiden zu einer vorgegebenen DNA-Sequenz, die für eine Hybridisierung und/oder eine Polymerase-Ketten Reaktion optimal geeignet sind.
- 30 - PCR: Abkürzung für Polymerase-Kettenreaktion. In vitro-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nucleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen.

- DNA-Template: Nukleinsäuremolekül oder ein Gemisch von Nukleinsäuremolekülen, aus denen ein DNA-Abschnitt mit Hilfe der PCR (s.o.) vervielfältigt wird.

5

- RNA: International gebräuchliche Abkürzung für Ribonukleinsäuren

10

- mRNA: International gebräuchliche Abkürzung für messenger-Ribonukleinsäuren, die am Transfer der genetischen Information aus dem Kern in die Zelle beteiligt sind und die Information für die Synthese eines Polypeptids oder eines Proteins beinhalten.

15

- Antisense Polynukleotid: Eine aus mehreren natürlichen oder modifizierten Nukleinsäuren bestehendes Molekül, deren Basenabfolge komplementär zur Basenabfolge eines Teilbereiches einer in der Natur vorkommenden RNA ist.

20

- PNA: International gebräuchliche Abkürzung für peptidic Nucleic Acids. Hierbei bilden peptidisch verknüpfte Aminosäuren eine Kette, wobei die Aminosäuren als Seitenkette eine für die Hybridisierung mit DNA oder RNA fähigen Base trägt.

25

- Sequenz: Abfolge von Nukleotiden oder Aminosäuren. Im spezifischen Sinne dieser Erfindung ist damit die Nukleinsäuresequenz gemeint.

30

- Ribozym: Bezeichnung für eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)
- DNA-Enzym: Bezeichnung für ein DNA-Molekül, das katalytische Aktivität beinhaltet (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)

- katalytische RNA/DNA: generelle Bezeichnung für Ribozyme bzw. DNA-Enzyme (s.o.).
- Adenovirus: bei Vertebraten vorkommender cytopathogener Virus
- Adenoassoziiertes Virus (AAV): Gehört zur Familie der Parvoviren. Für eine effektive Vermehrung des AAV ist eine Coinfektion der Wirtszellen mit Helferviren (z.B. Herpes-, Vaccina- oder Adenoviren) erforderlich. Die Eigenschaft von AAV, stabil in das Wirtsgenom zu integrieren, macht es als Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant.
- Herpesvirus: Viraler Erreger der Herpes-Infektion
- posttranslationale Modifikation: Veränderung an Proteinen oder Polypeptiden, die nach der Translation durchgeführt wird, hierzu zählen z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Amidierung, Acetylierung oder Proteolyse.
- glykosilieren: Bezeichnung für das Anhängen von einzelnen Zuckermolekülen oder ganzen Zuckerketten an Proteine.
- phosphorylieren: Bezeichnung für das Anhängen von einem oder mehreren Phosphatresten an ein Protein, bevorzugt an die OH-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin.
- amidieren: Die Bezeichnung für das Umwandeln einer Carboxylfunktion in eine Amidfunktion, z.B. an den carboxyterminalen Aminosäurerest eines Peptides oder Proteins.
- mit Membrananker versehen: Posttranslationelle Modifikation eines Proteins, oder eines anderen organischen Moleküls, derart daß es

durch Anhängen eines hydrophoben Moleküls, geeigneterweise eine Fettsäure oder ein Derivat derselben, an die Lipiddoppelschicht-Membran von Zellen verankert wird.

- 5 - spalten: in diesem spezifischen Fall die Spaltung eines Peptids oder Proteins in mehrere Untersequenzen.
- verkürzen: Ein aus mehreren Einzelteilen bestehendes Molekül um eine oder mehrere Teile zu verkürzen.
- 10 - Antikörper: Lösliche, oder an Zellmembranen gebundene, als Immunglobuline bezeichnete Proteine mit einer spezifischen Bindungsstelle für Antigene.
- 15 - monoklonaler Antikörper: sind gegen eine einzige antigene Determinante eines Antigens gerichtete Antikörper mit extrem hoher Selektivität
- polyklonaler Antikörper: Gemisch aus Antikörpern, die gegen mehrere
- 20 Determinanten eines Antigens gerichtet sind.
- transgen: genetisch verändert
- nichthumanes Säugetier: Die Gesamtheit der Säugetiere (Klasse der
- 25 Mammalia) mit Ausnahme der Spezies Mensch.
- Keim-Zelle: Zelle mit haploidem Genom, die durch Verschmelzung mit einer zweiten Keimzelle die Bildung eines neuen Organismus ermöglicht.
- 30 - somatische Zelle: diploide Zelle als Bestandteil eines Organismus

- chromosomale Einbringung: Eingriff in die Nukleotidsequenz auf chromosomaler Ebene
- Genom: Allgemeine Beschreibung für die Gesamtheit aller Gene in einem Organismus
- Vorfahr des Tieres: Ein Tier (der Vorfahr), das auf natürliche oder künstliche Weise durch Weitergabe an seinem genetischen Material in direkter Linie mit einem anderen Tier (dem Nachfahren) verwandt ist.
- exprimierbar: Ein Nukleinsäuremolekül ist dann exprimierbar, wenn es die Information zur Synthese eines Proteins oder Polypeptids beinhaltet und mit entsprechenden regulatorischen Sequenzen versehen ist, die eine Synthese dieses Proteins oder Polypeptids in vitro oder in vivo erlauben. Wenn diese Voraussetzungen nicht mehr gegeben sind, beispielsweise durch Eingriff in die kodierende Sequenz, ist das Nukleinsäuremolekül nicht mehr exprimierbar.
- Nagetier: Tier aus der Ordnung der Rodentia, z.B. Ratte oder Maus
- als schmerzregulierende Substanz identifizierbar: Substanz, die bei Einbringung in einen lebenden Organismus eine Verhaltensänderung bewirkt, die der Fachmann als schmerzhemmend bezeichnet (antinozizeptiv, antihyperalgetisch oder antiallodynisches). Im Falle des Screeningverfahrens bezieht sich dies darauf, daß die Substanz beim Screening durch stärkere Bindung oder Auslösung einer Änderung eines funktionellen Parameters deutlich, beispielsweise 100 %, die Bindung oder Wechselwirkung des Durchschnitts der getesteten Substanzen übertrifft.

- Verbindung: ein anderer Name für Molekül, als aus mehreren Atomen bestehend, hier ein durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziertes Molekül.
- 5 - Wirkstoff: Eine Verbindung, die bei Anwendung an einem Organismus eine Veränderung in diesem Organismus hervorruft. Im Besonderen werden darunter organisch-chemisch synthetisierte Moleküle verstanden, die auf den Organismus eine heilende Wirkung ausüben. Hier insbesondere Moleküle, die an die erfindungsgemäßen Proteine
10 und Peptide binden.
- niedermolekular: Molekül mit einem Molekulargewicht < 2kDa
- Arzneimittel: ein Stoff entsprechend der Definition im Artikel 1 §2 des
15 Gesetzes über den Verkehr mit Arzneimitteln
- Diagnostikum: Verbindung oder Verfahren, das verwendet werden kann, um eine Krankheit zu diagnostizieren
- 20 - Behandlung von Schmerz: Verfahren, mit dem Ziel Schmerzen zu lindern oder aufzuheben, oder das zu erwartende Auftreten von Schmerzen zu hemmen (preemptive Analgesie).
- chronischer Schmerz: eine Schmerzempfindung von länger anhaltender
25 Dauer, oft dadurch gekennzeichnet, daß sie über Zeitpunkt und Ort des initialen Stimulus hinausreicht, die Schmerzempfindlichkeit des Körpers steigert.
- Gentherapie: Unter Gentherapie versteht man alle Verfahren, die das
30 Ziel haben, genetische Erkrankungen durch geeignete Veränderungen des Genoms kausal zu behandeln.

- In-vivo-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in den lebenden Organismus mit dem Ziel der Gentherapie. Man kann zwischen somatischem und Keimbahn-Eingriff unterscheiden, der einmal an diploiden Zellen und einmal an haploiden Zellen stattfindet.

5

- In-vitro-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in Zellen außerhalb des menschlichen Körpers mit dem Ziel diese nachher wieder durch Einbringen in den menschlichen Körper zur Gentherapie zu verwenden.

10

- Diagnostik: Verfahren, um eine Krankheit zu identifizieren.

- Wirksamkeitsuntersuchung: Untersuchung mit dem Ziel die Wirksamkeit einer Verbindung nach Einwirkung auf einen lebenden Organismus zu untersuchen.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert. Dabei wird genetisches Material in die Zelle eingebracht, insbesondere eine oder mehrere Polynukleotidsequenzen. In einer weiter bevorzugten Variante dieser Ausführungsform erlaubt die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter. In dieser Ausführungsform werden durch gentechnische Manipulation Voraussetzungen geschaffen unter denen die Veränderung eines funktionellen Parameters überhaupt oder verbessert gemessen werden kann. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reportergen eingeführt wird. Darunter ist insbesondere die gentechnische Einführung eines endogen nicht vorhandenen oder physiologisch nicht exprimierten G-Proteins (GTP-bindenden Proteins) in die Zelle zu verstehen, beispielsweise die Einführung eines chimären G-Proteins, das eine Veränderung des

20

25

30

Signalweges erlaubt oder eines promiskuitiven G-Proteins, das sehr bindungsfreudig ist. Die Einführung eines Reportergens wiederum erlaubt die Messung einer (extrazellulär ausgelösten) induzierten Expression des Genproduktes.

5

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zelle gentechnisch so manipuliert wird, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise zu mindestens 95 %, insbesondere zu mindestens 97 % ähnliches Polynukleotid enthält. Damit kann beispielsweise erreicht werden, daß ein Teilprotein oder Protein, das in der im Verfahren verwendeten Zelle oder Präparation nicht endogen exprimiert wird, von der Zelle synthetisiert wird. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, wenn das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist. Unter einem (rekombinanten) DNA-Konstrukt versteht man ein in-vitro hergestelltes DNA-Molekül.

15

20

25

30

Wenn beim Verfahren vor dem Schritt a) die Zelle gentechnisch manipuliert wird, ist es bevorzugt, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation und vor dem Schritt (a) unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck. Unter kultivieren versteht man, Zellen oder Gewebe bei Bedingungen, die ein Überleben der Zellen, bzw. deren Nachfolgegeneration sichern, zu halten. Dabei sollten die Bedingungen hier so gewählt werden, daß eine Expression des durch die gentechnische Manipulation eingefügten Materials ermöglicht wird. Dazu sollten pH, Sauerstoffgehalt, und Temperatur physiologisch gehalten sein und ausreichend Nährstoffe und notwendige Cofaktoren beigelegt sein. Der Selektionsdruck erlaubt, nur die Zellen weiter zu kultivieren, bei denen die gentechnische Manipulation zumindest teilweise erfolgreich war. Dazu gehört beispielsweise die Einführung einer Antibiotikaresistenz über das DNA-Konstrukt.

Es ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren besonders bevorzugt, wenn die verwendete Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist. Beispiele für Amphibienzellen sind *Xenopus* Oocyten, für Bakterienzellen E-coli-Zellen, für Hefezellen auch *Saccharomyces cerevisiae*, für Insektenzellen Sf9-Zellen, für immortalisierte Säugetierzelle HeLa-Zellen und für native Säugetierzellen die CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelle.

Bei einer bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der Bindung der Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden vom Teilprotein oder Protein und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz. Dabei ist ein Ligand ein mit hoher Spezifität an das Protein oder Teilprotein bindendes Molekül, das durch eine ebenfalls bindende, zu testende Substanz aus der Bindungsstelle verdrängt wird. Unter Markierung ist eine den Nachweis erleichternde künstliche Modifikation am Molekül zu verstehen. Beispiele sind radioaktive, fluoreszierende oder lumineszierende Markierung.

Bei einer anderen bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der durch die Bindung der Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren ausgelösten Veränderung der funktionellen Parameter, erfolgt die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen, insbesondere über Messung der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger. Damit ist auf der einen Seite direkt die Messung der Wirkung der Substanz über die Beeinflussung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfaßt, auf der anderen Seite als bevorzugt zu messende Beispiele sich ändernder Parameter wie Genexpression, Ionenmilieu, pH, Membranpotential,

Enzymaktivität oder Konzentration der 2nd messenger. Dabei versteht man unter Ionenmilieu insbesondere die Konzentration eines oder mehrerer Ionen in einem Zellkompartiment, insbesondere dem Cytosol, unter Membranpotential die Ladungsdifferenz zwischen zwei Seiten einer Biomembran und unter 2nd messenger Botenstoffe des intrazellulären Signalwegs wie z.B. zyklisches AMP (cAMP), Inositoltriphosphat (IP3) oder Diacylglycerol (DAG).

Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem ein erstes erfindungsgemäßes Verfahren mit einem zweiten erfindungsgemäßen Verfahren derart gekoppelt wird, daß die Meßwerte und Ergebnisse des ersten Verfahrens hinsichtlich der zu messenden Substanz mit den Meßwerten und Ergebnissen des zweiten Verfahrens hinsichtlich der zu messenden Substanz verglichen werden, dadurch gekennzeichnet, daß in einem der zwei Verfahren, im folgenden Hauptverfahren genannt, im Schritt (a) die zu testende Substanz

entweder

mit einem Biomolekül aus Gruppe II: dem Protein BNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnlichen Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet, oder einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle

und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens eines der vorgenannten Proteine und/oder Teilproteine synthetisiert hat,

5 oder

mit einem Biomolekül aus Gruppe III: dem Protein DNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 2b) oder 2d) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a) oder 2c) oder deren Antisense Polynukleotide bindet, oder einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens eines der vorgenannten Proteine und/oder Teilproteine synthetisiert hat, inkubiert wird,

und

25 daß im anderen der zwei Verfahren, im folgenden Nebenverfahren genannt, im Schritt (a) die zu testende Substanz mit einem Biomolekül aus der Gruppe I oder mit einem Biomolekül aus derjenigen Gruppe ausgewählt aus Gruppe II und Gruppe III inkubiert wird, aus der das Biomolekül, mit der die Substanz im Hauptverfahren inkubiert wird, nicht ausgewählt ist.

Unter dieser besonders bevorzugten Ausführungsform ist insbesondere die Kombination der Messung der Bindung an BNPI oder davon abgeleiteten Biomolekülen oder der Messung der daraus entstehenden Modifikation zellulärer Parameter auf der einen und der Bindung an DNPI und jeweils davon abgeleiteten Biomolekülen oder der Messung der daraus entstehenden Modifikation zellulärer Parameter auf der anderen Seite zu verstehen, da gerade ein Vergleich angesichts der vollkommen getrennten aber eng aneinanderliegenden Verteilung der beiden Kanäle im Gewebe einen wichtigen Aufschluß über physiologische Funktionen geben kann. Damit erlaubt aber der differentielle Abgleich der Daten die Identifizierung optimiert pharmazeutisch bzw. medizinisch wirksamer Substanzen.

Weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren worin die aufzufindenden Substanzen ausgewählt sind aus:

Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur Behandlung von Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Morbus Parkinson, Katarakt, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Schlafstörungen, Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Neuroinflammation, Insomnia, zur adjuvanten Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

vorzugsweise

Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur
Behandlung von Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus
Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz
amyotrophe Lateralsklerose, Gewichtsregulation, Obesitas,
Katarakt, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen,
Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung,
Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans,
Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn,
Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei
Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain;
Neuroinflammation

insbesondere

Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur
Behandlung von Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus
Degeneration, Katarakt, Netzhautablösung, Retinadegeneration,
Glaukom oder Nystagmus
und/oder

Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Erkrankungen des
Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans oder Erkrankungen der
Hörbahn oder Vestibularbahn.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Verbindung identifizierbar
als pharmazeutisch relevante Substanz mit Wirksamkeit in mindestens
einer der vorgenannten Indikationen durch ein erfindungsgemäßes
Verfahren. Hierbei bezieht sich Verbindung insbesondere auf
niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch auf Peptide, Proteine und
Nukleinsäuren. Dabei bedeutet identifizierbar, daß die Verbindung das
Merkmal aufweist, daß es beim erfindungsgemäßen Screeningverfahren
bezüglich der Bindung deutlich stärker, vorzugsweise doppelt so stark
bindet wie der Durchschnitt der zu testenden Substanzen oder bezüglich

der Änderung der funktionellen Parameter deutlich vom Durchschnitt der zu testenden Substanzen abweicht. Besonders bevorzugt ist es, wenn die erfindungsgemäße Verbindung eine niedermolekulare Verbindung ist.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- 10
- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise zu wenigstens 95%, insbesondere zu wenigstens 97% oder genau entspricht,
 - 15 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
 - 20 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
 - 25 d. von BNPI und/oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins,
 - 30

für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. einer erfindungsgemäßen Verbindung identifizierbar als pharmazeutisch relevante Substanz mit Wirksamkeit in mindestens einer der vorgenannten Indikationen wie oben beschrieben und/oder
- h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) bindet,

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration,
Hörstörungen, Tinitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien,
5 Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung,
amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas,
Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington,
Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken),
Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei
10 Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis,
Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder
bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob,
Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und
cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der
15 Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma,
Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem,
diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische
Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen
Nervensystems, Störungen des Nervensystems des
20 Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere
glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration
insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie;
Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung,
Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung
25 insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom,
Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums,
cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen
des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder
Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder
30 Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des
Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-
Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen;

Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol,
 Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit
 Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation,
 neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des
 5 spinalen Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien,
 Erkrankungen der Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien,
 Neuroinflammation, Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder
 Fieber, Stress, Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien,
 Chinese-Restaurant-Syndrom, Agression, Paranoia,
 10 Hirnerschütterung, neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom,
 cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale Apoptose,
 Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-
 Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt,
 Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen
 15 der Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus oder mit
 Wirksamkeit zur Förderung der Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der
 Kognition oder des Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur
 Liquordiagnostik neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten
 Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei
 20 Parkinson.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- 25 a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA,
 kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids,
 vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer
 der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten
 Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise zu
 wenigstens 95%, insbesondere zu wenigstens 97%
 30 entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense
 Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-

Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,

f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)

zur Herstellung eines Arzneimittels zum Einsatz in der Gentherapie. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt. Unter Gentherapie versteht man eine Therapieform, bei der durch die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ein Effektorgen, meist ein Protein, exprimiert wird. Man unterscheidet prinzipiell In-vivo- und In-vitro-Verfahren. In In-vitro-Verfahren werden Zellen aus dem Organismus entfernt und ex-vivo mit Vektoren transfiziert, um anschließend wieder in denselben oder in einen anderen Organismus eingebracht zu werden. Bei der In-vivo-Gentherapie werden Vektoren, beispielsweise zur Bekämpfung von Tumoren, systemisch (z.B. über die Blutbahn) oder direkt in das Zielgewebe (z.B. in einen Tumor) appliziert.

Bevorzugt ist es beim Einsatz in der Gentherapie weiter, wenn es sich um ein Arzneimittel mit Wirksamkeit in der Indikation oder zur Behandlung von

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration,
 Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien,
 Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung,
 5 amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation,
 Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea
 Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische
 Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei
 Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis,
 10 Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen
 oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob,
 Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und
 cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen
 der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma,
 15 Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem,
 diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische
 Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen
 Nervensystems, Störungen des Nervensystems des
 Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere
 20 glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration
 insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie;
 Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung,
 Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung
 insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom,
 25 Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums,
 cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen
 des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder
 Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder
 Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des
 30 Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless
 Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen;
 Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol,

Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit
 Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne
 Alkoholintoxikation, neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen,
 Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien,
 5 Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen,
 alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation,
 Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress,
 Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-
 Restaurant-Syndrom, Agression, Paranoia, Hirnerschütterung,
 10 neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre
 Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale
 Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death
 (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie,
 multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie
 15 Impotenz oder Priapismus oder mit Wirksamkeit zur Förderung der
 Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der Kognition oder des
 Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur Liquordiagnostik
 neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten Therapie per
 Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

20 handelt.

Bevorzugt beim Einsatz in der Gentherapie ist auch die Verwendung eines
 Polynukleotids, beim dem es sich um ein Antisense Polynukleotid oder
 25 PNA handelt, oder das Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms
 oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung

- 30 a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA,
 kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids,
 vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer

der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

- 5 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 10 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- 15 d. von BNPI und/oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten
- 20
- 25
- 30

Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e),
- g. einer erfindungsgemäßen Verbindung identifizierbar als pharmazeutisch relevante Substanz mit Wirksamkeit in mindestens einer der vorgenannten Indikationen wie oben beschrieben und/oder
- h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) bindet,

zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose eines Zustands ausgewählt aus

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei

Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie; Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung, Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums, cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen; Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation, neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation, Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress, Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-Restaurant-Syndrom, Aggression, Paranoia,

Hirnerschütterung, neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus.

Dabei versteht man unter Diagnostik die Analyse von einem Krankheitsbild zugeordneten Symptomen und unter Wirksamkeitsuntersuchungen Untersuchungen über die Wirksamkeit zu testender Substanzen, insbesondere ihrer medizinischen Wirksamkeit.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Peptids oder Proteins, bei dem eine erfindungsgemäße Zelle, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält, kultiviert und gegebenenfalls das Peptid oder Protein isoliert wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

- 5 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- 10 d. von BNPI und/oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,
- 15 20 e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- 25 f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 30

in einem Verfahren zur Auffindung pharmazeutisch relevanter Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur Behandlung von

5

10

15

20

25

30

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie; Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung, Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums, cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder

5 Vesibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des
 Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless
 Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen;
 Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol,
 Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit
 Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne
 Alkoholintoxikation, neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen,
 Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien,
 Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen,
 10 alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation,
 Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress,
 Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-
 Restaurant-Syndrom, Agression, Paranoia, Hirnerschütterung,
 neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre
 15 Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale
 Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death
 (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie,
 multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie
 Impotenz oder Priapismus oder mit Wirksamkeit zur Förderung der
 20 Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der Kognition oder des
 Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur Liquordiagnostik
 neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten Therapie per
 Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson.

25 Generell ist es bei allen vorgenannten erfindungsgemäßen Verwendungen
 bevorzugt, wenn die Indikation oder die zu behandelnde oder zu
 diagnostizierende Krankheit ausgewählt ist aus

30 Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration,
 Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz amyotrophe
 Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas,
 Morbus Parkinson, Katarakt, Virus-Infektionen oder bakterielle

Infektionen, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Schlafstörungen, Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Neuroinflammation, Insomnia, zur adjuvanten Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

vorzugsweise

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz amyotrophe Lateralsklerose, Gewichtsregulation, Obesitas, Katarakt, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn; Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Neuroinflammation

insbesondere

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Katarakt, Netzhautablösung, Retinadegeneration, Glaukom oder Nystagmus

oder

Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans oder Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn.

5

10

15

20

25

30

Mit den erfindungsgemäß verwendeten Polynukleotid sind auch die dargestellten Genfragmente selbst umfaßt, wie auch ein Polynukleotid, das entweder vollständig oder zumindest Teilen der kodierenden Sequenz des dem Fragment entsprechenden Gens entspricht. Damit sind auch Polynukleotide gemeint, die mindestens 90%-ige, vorzugsweise 95%-ige, insbesondere wenigstens 97%-ige Übereinstimmung in der Basenabfolge mit der kodierenden Sequenz der abgebildeten Polynukleotide oder der kodierenden Sequenz der Gens aufweisen. Es ist weiter bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um RNA bzw. ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA handelt. Ebenso ist es bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um ein Antisense-Polynukleotid oder PNA handelt, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an ein erfindungsgemäßes Polynukleotid zu binden. Dabei versteht man unter PNA „peptidic nucleic acid“ (peptidische Nukleinsäure), die zwar die Basenpaare trägt, aber dessen Rückrat peptidisch gebunden ist. Ein Antisense-Polynukleotid zeigt die komplementäre Basenabfolge zu mindestens einem Teil einer Basis-Nukleinsäure. Ebenfalls bevorzugt ist es, daß das Polynukleotid Teil eines Ribozym oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA bzw. DNA ist. Unter Ribozym ist eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure zu verstehen, unter DNA-Enzym ein entsprechende Desoxyribonukleinsäure, also katalytische RNA beziehungsweise DNA.

Ein ganz besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein, insbesondere erfindungsgemäß verwendetes Polynukleotid oder auch Oligonukleotid, bei dem mindestens eines der Nukleotide, insbesondere mehrere der Nukleotide, „Locked Nucleic Acids“ („LNA's“) sind oder mindestens eines der Nukleotide, insbesondere alle Nukleotide,

Phosphorothioate sind, vorzugsweise ein solches, bei dem mehrere der Nukleotide „Locked Nucleic Acids“ („LNA's“) sind. „Locked nucleic acids“ („LNA's“) sind Ribonukleotide, die eine Methylen-Brücke enthalten, die den 2'-Sauerstoff der Ribose mit dem 4'-Kohlenstoff verbindet (s. Abb. 27).

5 Einen Überblick über die LNA's geben Braasch D.A. und Corey, D.R. (2001), Locked nucleic acids (LNA); fine-tuning the recognition of DNA und RNA. Chem. Biol. 8, 1-7. Dieser Artikel ist ausdrücklich Mitbestandteil der vorliegenden Beschreibung und Offenbarung. LNA's werden beispielsweise von der Firma Proligo, Boulder, CO, USA angeboten. Auch
10 Phosphorothioate sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise bei MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany bestellt werden.

Unter dem erfindungsgemäß verwendeten Vektor versteht man ein Nukleinsäuremolekül, das bei gentechnischer Manipulation dazu dient,
15 Fremdgene zu enthalten bzw. zu übertragen. Besonders bevorzugt ist dabei, daß es sich um einen Expressionsvektor handelt. Er dient damit der Expression des enthaltenen Fremdgens, des Polynukleotids. Weiter bevorzugt ist ein derartiger Vektor, der abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus
20 und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält. Ein LTR ist ein „Long-TerminalRepeat“, ein am Ende befindlicher Abschnitt beispielsweise bei Viren. Poly-A-Sequenz ist ein mehr als 20 Adenosinreste langer Schwanz. Eine Promotorsequenz ist der Steuerungsbereich für die Transkription.

25 Bevorzugt ist es für ein verwendetes Protein bzw. ein daraus abgeleitetes Teilprotein, wenn diese posttranslational modifiziert wurde, es insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen,
30 gespalten oder verkürzt wurde. Posttranslationale Modifikationen sind beispielsweise dem Voet/Voet, Biochemistry, 1st Edition, 1990, S. 935-938 zu entnehmen.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt a) und/oder Punkt b)) eine RNA oder eine ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA ist.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt b)) Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) ein Expressionsvektor ist.

Dabei ist es weiter für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn das Protein oder Teilprotein (gegebenfalls gemäß Punkt d)) posttranslational modifiziert wurde, es insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn der Antikörper (gegebenfalls gemäß Punkt e)) ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei der Zelle (gegebenenfalls gemäß Punkt f)) um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt.

5

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei der Verbindung (gegebenenfalls gemäß Punkt g)) um eine niedermolekulare Verbindung handelt.

10

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der genannte Wirkstoff gemäß Punkt h) ein niedermolekularer Wirkstoff ist.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung, eines nichthumanen Säugetieres oder Menschen, das oder der eine Behandlung von Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, Alzheimer, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte

30

Übererregbarkeit, Neurodegeneration insbesondere bei Morbus Alzheimer,
 Morbus Alzheimer, Ischämie; Encephalitis insbesondere virale oder
 bakterielle; Prionerkrankung, Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis,
 amyotrophe Lateralsklerose, Demyelinisierung insbesondere bei multipler
 5 Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung,
 Erkrankungen des Cerebellums, cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der
 Basalganglien, Erkrankungen des Pallidums, Erkrankungen des Hör-
 und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder
 Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des Lernens,
 10 Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-Syndrom,
 Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen, Anorexia nervosa;
 Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug, insbesondere bei Alkohol,
 Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit
 Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation,
 15 neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des spinalen
 Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien, Erkrankungen der
 Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation,
 Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress,
 Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-Restaurant-
 20 Syndrom, Aggression, Paranoia, Hirnerschütterung, neuroendokrine
 Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale
 Apoptose, Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-
 Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt,
 Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der
 25 Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus oder eine Förderung der
 Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der Kognition oder des Gedächtnisses,
 Neuroprotektion, Liquordiagnostik neurostatistischer Erkrankungen oder
 adjuvante Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei
 Parkinson benötigt, durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen
 30 Arzneimittels, insbesondere solche enthaltend eine erfindungsgemäße
 Substanz und/oder einen an BNPI und/oder DNPI bindenden Wirkstoff.

Die Verabreichung kann beispielsweise in Form eines Arzneimittels wie oben beschrieben erfolgen.

5

Die folgenden Beispiele und Abbildungen sollen die Erfindung erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

10

Abbildungen und Beispiele

15

Abbildungen:

20

- Fig. 1a) cDNA-Sequenz von BNPI, human; AN: NM_020309
- Fig. 1b) Aminosäure-Sequenz von BNPI, human; AN: NM_020309
- Fig. 1c) cDNA-Sequenz von BNPI, human; Nr.: AAT42064 aus WO96/34288
- Fig. 1d) Aminosäure-Sequenz von BNPI, human; Nr.: AAT42064 aus WO96/34288
- Fig. 1e) cDNA-Sequenz von BNPI, Ratte; AN: U07609
- Fig. 1f) Aminosäure-Sequenz von BNPI, Ratte; AN: U07609
- 25 Fig. 2a) cDNA-Sequenz von DNPI, human; AN: AB032435
- Fig. 2b) Aminosäure-Sequenz von DNPI, human; AN: AB032435
- Fig. 2c) cDNA-Sequenz von DNPI, Ratte; AN: AF271235
- Fig. 2d) Aminosäure-Sequenz von DNPI, Ratte; AN: AF271235
- Fig. 3) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen und motorischen Arealen des lumbalen Rückenmarks der Ratte (s. Beispiel 2a)
- 30 Fig. 4) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen der Dorsalhorn-Arealen des lumbaren Rückenmarks der Ratte (s. Beispiel 2b)
- Fig. 5) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen des sakralen Rückenmarks der Ratte (s. Beispiel 2c)
- Fig. 6) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen der medullo-cervicospinalen Leitung des Trigeminalnervs der Ratte (s. Beispiel 2d)
- 40 Fig. 7) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2e)

- Fig. 8) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2f)
- Fig. 9) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2g)
- 5 Fig. 10) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2h)
- Fig. 11) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2i)
- 10 Fig. 12) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2j)
- Fig. 13) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2k)
- Fig. 14) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2l)
- 15 Fig. 15) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2m)
- Fig. 16) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2n)
- 20 Fig. 17) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2o)
- Fig. 18) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2p)
- Fig. 19) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 2q)
- 25 Fig. 20) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte, dabei heißt AS Anti-sense und bezieht sich auf die Färbung.
- 30 Fig. 21) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Hinregionen der Ratte, dabei heißt AS Anti-sense und bezieht sich auf die Färbung.

Beispiele:

35 Beispiel 1

Differentielle Betrachtung der Expression zwischen DNPI und BNPI über immuncytochemische Färbung

40 Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden polyklonale Kanichen-Antiseren gegen das rekombinante DNPI- bzw. BNPI-Fusionsprotein verwendet. Generell wurden Schnitte verschiedener Regionen des ZNS angelegt und die Expression von DNPI mit der von BNPI verglichen. Das Vorgehen entsprach bezüglich der Schnitte und der Färbung dem bei

Persson S., Schäfer MK-H., Nohr D., Ekström G., Post C., Nyberg F. und Weihe E. (1994), Neuroscience 63; 313-326 bzw. Nohr D., Schäfer MK-H., Romeo H., Persson S., Nyberg F. Post C. und Weihe E. (1999), Neuroscience 93; 759-773 beschriebenen Verfahren, wobei die
 5 Offenbarung dieser Artikel ausdrücklich zum Teil der hier vorgelegten Offenbarung der Erfindung gemacht wird.

Beispiel 2a zu Abbildung 3)

10 Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI im lumbaren Rückenmark der Ratte zu sehen. Die angrenzenden deparafinierten Abschnitte A- bis D sind wie folgt gefärbt:

A = anti-DNPI;

15 B = anti-DNPI präadsorbiert mit DNPI-Fusionsprotein;

C = anti-BNPI;

D = anti-BNPI präadsorbiert mit BNPI-Fusionsprotein;

20 Die DNPI- (A) und BNPI- (C) Immunfarbstoffe waren voll mit homologem rekombinanten BNPI- (D) und BNPI- (B) Fusionsprotein präadsorbierbar, was die Spezifität der Immunreaktion beweist.

Bemerkenswert ist das gegenseitig ausschließende Verteilungsmuster von DNPI und BNPI-Immunfärbung im äußeren und tiefen Dorsalhorn.
 25 (A;C).Punktierte Immunfärbung von DNPI ist in den synaptischen Endungen des äußeren Dorsalhorns (Lamina 1 und Substantia gelatinosa) (Pfeil in A), während BNPI Immunreaktivität vollständig fehlt (Pfeile in B). Akkumulation von starker positiver punktierter BNPI-Immunfärbung liegt im tieferen Dorsalhorn vor, während DNPI-Färbung
 30 relativ niedrig ist. DNPI ist präsent in der lateralen spinalen Nukleus (LSN in A), während BNPI völlig fehlt (LSN in C). DNPI ist in der Lamina X um den

zentralen Kanal abundant, während BNPI selten ist. BNPI Immunfärbung ist im lateralen Ventralhorn schwach und gering oder fehlend im medialen Ventralhorn. Durch das ganze Ventralhorn ist punktförmige DNPI-Färbung abundant, etwas weniger im lateralen Horn im Vergleich zum medialen Ventralhorn. Es gibt eine schwache BNPI und DNPI Färbung in einigen Zellkörpern der im Ventralhorn gelegenen Motoneurone, was aber nicht durch die homologen transporter Fusionsproteine präadsorbiert wurde und daher als nichtspezifisch eingestuft wurde.

10 **Beispiel 2b zu Abbildung 4)**

Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI im linken lateralen oberflächlichen dorsalen lumbaren Rückenmark (left lateral superficial dorsal lumbar spinal cord) der Ratte zu sehen. A und B jeweils für BNPI (A) und DNPI (B) gefärbt zeigen viele punktförmige Anfärbungen für DNPI, die in der Lamina I und substantia gelatinosa konzentriert sind wo BNPI fast vollständig fehlt. Weiter sind dichte Komplexe von DNPI positiven Punkten im lateralen spinalen Nukleus zu sehen, wo BNPI fast vollständig fehlt. Feine DNPI positive Punkte sind auch in den tieferen dorsalen Horn zu finden, wenn auch mit geringerer Dichte.

Beispiel 2c zu Abbildung 5)

Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI im sakralen Rückenmark der Ratte zu sehen. Die angrenzenden Abschnitte A und B jeweils für BNPI (A) und DNPI (B) gefärbt, zeigen gegenseitige Exclusions-Zonen punktierter DNPI- und BNPI-Immunfärbung im Dorsalhorn. DNPI ist in der gesamten Grey Matter präsent und ist in den sehr äußeren Schichten des Dorsalhorns konzentriert, wo es eine schmale Bande an der Grenze zu White Matter bildet. DNPI ist abundant

im lateralen spinalen Nukleus und in der Lamina X wie auch in der Lamina V/VI und im ganzen ventralen Horn. BNPI ist abundant im tiefen Dorsalhorn und selten in Ventralhorn.

5 **Beispiel 2d zu Abbildung 6)**

Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI in der unteren Medulla oblongata am Übergang zum cervicalen Rückenmark zu sehen. Die angrenzenden Abschnitte A und B jeweils für BNPI (A) und DNPI (B) gefärbt zeigen eine bevorzugte Akkumulation der BNPI-Färbung im medialen Teil des spinalen trigeminalen Nukleus und in dem mittleren und unteren Teil der dorsalen Medulla. es ist nur eine sehr schwache Färbung mit BNPI in den ventralen Medulla zu sehen. DNPI ist abundant in Grey Matter der Medulla. DNPI-Färbung überlappt mit der BNPI-Färbung im inneren spinalen Nucleus V. Es ist zu beachten, daß BNPI auch im oberen spinalen trigeminalen Nukleus, der gleich der spinalen substantia gelatinosa ist, zu finden ist. DNPI-Färbung ist in Gebieten schwächer, in denen BNPI präsent ist, schwächer als in Gebieten, wo BNPI niedrig ist oder fehlt. Einige wenige BNPI Punkte sind im ventralen Grey Motor Gebiet zu sehen.

Beispiel 2e zu Abbildung 7)

Komplementär differentielle Verteilung von DNPI und BNPI Immunreaktivität in 2 Folgeschnitten des Rattenhirns in schmerzrelevanten Hirnregionen wie sensorischer parietaler Cortex; cingulärer Cortex, Thalamus, Corpus amygdaloideum sowie auch Hypothalamus. DNPI ist im Cortex in den granulären sensorischen Schichten insbesondere in Lamina IV konzentriert; BNPI ist im Cortex abundant aber schwächer in der Lamina IV als in anderen Laminae. Im cingulären Cortex (C vs D als Hochvergrößerung) ist die Verteilung von DNPI und BNPI komplementär

wechselseitig excludierend bzw. reziprok in der Dichte der jeweiligen Synapsen. DNPI überwiegt im Thalamus eindeutig über BNPI, BNPI ist im Hypothalamus spärlich, DNPI abundant. Abundantes BNPI überwiegt im Hypocampus über spärliches DNPI bei wechselseitig komplementärer Verteilung.

Thalamus = Th,

Amygdala = Amyg.

Hippocampus = Hip,

Cingulärer Cortex = Cg,

Hypothalamus = Hy,

parietaler Cortex = PC.

Beispiel 2f zu Abbildung 8)

Komplementär differentielle Verteilung von DNPI und BNPI Immunreaktivität in schmerzrelevanten Hirnregionen wie cingulärer Cortex (Cg) und Tectum sowie dorsalem periaquäductalen Grau. DNPI Dominanz im Tectum und dorsalem Grau. Folgeschnitte eines Rattenhirns durch das obere Mesencephalon.

Beispiel 2g zu Abbildung 9)

Komplementär differentielle Verteilung von DNPI und BNPI Immunreaktivität in schmerzrelevanten Hirnregionen wie Tectum (T) sowie periaquäductalen Grau (PAG). DNPI Dominanz im Tectum und dorsalem Grau. Man notiere differentielle Verteilung von DNPI und BNPI im corpus geniculatum mediale (cgm) der Hörbahn. Folgeschnitte eines Rattenhirns durch das obere Mesencephalon; Ebene colliculus superior.

Beispiel 2h zu Abbildung 10)

Abundanz von DNPI über BNPI in den Habenulae (Hb). DNPI ist präsent im gesamten Habenularkomplex (niedrige Vergrößerung, obere Abbildung; hohe Vergrößerung, mittlere Abb.). BNPI ist nur im medialen Habenularkern (mHb untere Abb., Folgeschnitt zu mittlerer Abbildung).

In den folgenden Beispielen 2i bis 2q und den zugehörigen Abbildungen 11- 19 wird der Begriff VGLUT1 für BNPI und VGLUT2 für DNPI verwendet. Die Begriffe sind jeweils vollkommen synonym, inhaltlich völlig gleich und betreffen den gleichen Gegenstand, also VGLUT1 = BNPI und VGLUT2 = DNPI. „preabs“ bedeutet die Präabsorption mit VGLUT1-oder VGLUT2-Fusionsprotein vor der Immunfärbung.

Beispiel 2i zu Abbildung 11)

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung und der Spezifität im lumbaren Rückenmark über die Immunoreaktivität.

Die angrenzenden Abschnitte A-D sind abwechselnd mit anti-VGLUT2 (A), anti-VGLUT2, präabsorbiert mit VGLUT2-Fusionsprotein (B), anti-VGLUT1 (C) und anti-VGLUT1, präabsorbiert mit VGLUT1-Fusionsprotein (D) gefärbt. Die Immunoreaktionen in (A) und (C) werden vollständig mit homologem rekombinanten Fusionsprotein präabsorbiert (B) und (D), was die Spezifität der Immunreaktion zeigt. Zu beachten ist das differentielle Verteilungsmuster im oberflächlichen und tiefen Dorsalhorn (A;C). Punktförmige Immunfärbung für VGLUT2 ist im oberflächlichen Dorsalhorn zu erkennen (Pfeile kennzeichnen in A Lamina 1 und Substantia gelatinosa), wo die Immunreaktivität mit VGLUT1 minimal ist (Pfeile in C). Zu beachten ist weiter die Akkumulation stark positiver punktförmiger

VGLUT1 im tiefen Dorsalhorn, wo VGLUT2 relativ schwach ist. VGLUT2 ist im lateralen spinalen Nukleus vorhanden (LSN; Pfeile in A), wo VGLUT1 nur gering vertreten ist (Pfeile in C). VGLUT2 ist stark in Lamina X um den zentralen Kanal herum vertreten, wo VGLUT1 selten ist. Die Immunfärbung von VGLUT1 ist schwach bis mittelmäßig im lateralen ventralen Horn und sehr dünn im medialen ventralen Horn. Eine feine punktförmige VGLUT2-Anfärbung ist dicht und reichlich im Ventralhorn (VH).

Beispiel 2j zu Abbildung 12)

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im Vorderhirn (1).

Paare von Low-Power- und High-Power-Micrographen von zwei angrenzenden Frontalsektionen sind alternativ für VGLUT2 (A-D, I, K, M) und VGLUT1 (E-H, J, L, N) gefärbt. Dies zeigt die deutliche Differenz und die teilweise gegenseitige Ausschließlichkeit in der Verteilung, Dichte und Intensität von VGLUT1 und VGLUT2 Immunoreaktivität (ir) in ausgewählten corticalen, hippocampalen, diencephalischen und limbischen Bereichen.

Hypothalamus und Thalamus (A,E): Punktförmige VGLUT2-ir ist relativ stark über den ganzen Hypothalamus und Thalamus, wo VGLUT-2 eine beschränkte Verteilung auf den hypothalamischen, ventralen premammillaren Nukleus (PMV) und auf Teile des thalamischen Nukleus inclusive des lateralen hinteren thalamischen Nukleus (LP), dem dorsalen lateralen geniculaten Nukleus (DLG) und dem ventralen posteromedialen thalamischen Nukleus (VPM) zeigt. Olivärer prätectaler Nukleus (OPT); dorsaler vorderer prätectaler Nukleus (APTD); precommisuraler Nukleus (PrC).

Cortex (A; E; I; J; K; L; M; N): Die VGLUT2-Färbung ist in einem Band des Neocortex enthaltend Lamina IV moderat. Sie ist schwach in einem

neocorticalem Band enthalten Lamina VI und minimal in den anderen neocorticalen Schichten. Intensive punktförmige VGLUT1-ir ist sehr stark im gesamten Cortex, inclusive des piriform Cortex (Pir) und etwas schwächer ausgeprägt im neocortikalen Band der Lamina VI, wo moderate VCGLUT2-Färbung akkumuliert. Zu beachten ist der gegenseitige Ausschluß von VGLUT1- und VGLUT2-Färbung in den Schichten des retrosplenialen granularen Cortex (RSG in A und E), die in starker Vergrößerung in (I) und (J) gezeigt werden. Die großen Vergrößerungen M und N aus der Lamina IV in K und L zeigen verschiedene Dichten der punktförmigen VGLUT1- und VGLUT2-ir im Vergleich zwischen immunonegativen neuronalen Zellkörpern und -Prozessen.

Hippocampus (A, E; B-D, F-H): Dünne VGLUT2-ir-Punkte sind meist beschränkt auf die granularen Schichten (g) des dentaten Gyrus (DG) und der pyramidalen Schicht (p) der Felder CA1, CA2 und CA3 des Hippocampus. Dichte V-GLUT1-ir-Punkte sind sehr stark über den gesamten Hippocampus vertreten mit Ausnahme der granularen (g) und pyramidalen (p) Zell-Schichten. Mit Rechtecken gekennzeichnete Abschnitte in A und entsprechende Abschnitte auf angrenzenden Sektionen in E werden mit großer vergrößerung jeweils in B-D und F-H gezeigt. zu beachten sind die differentielle Verteilung und Dichte der VGLUT1-ir und VGLUT2-ir in der Oriens-Schicht (o), pyramidalen Schicht (p); im Stratum radiatum (r) und dem Stratum lacunosum molekulare (l) von CA1 (B,F) und CA3 (C, G) und in der molekularen (m), granularen (g) und polymorphen (p) Schicht des dentaten Gyrus (DG) (D,H).

Amygdala Complex: Hier ist eine gewisse Überlappung festzustellen, aber die differentielle Dichte und Intensität der Immunfärbung von VGLUT1-ir und VGLUT2-ir Punkten im hinteren basomedialen amygdaloiden Nukleus (BMP), im lateralen amygdaloiden Nukleus (La) und im cortikalen amygdaloiden Nukleus (Co.) wie auch im angrenzenden dorsalen endopiriformen Nukleus (DEn) ist deutlich zu sehen.

Es ist weiter festzustellen, daß „White Matter“ und Faser Trakte VGLUT1- und VGLUT2-negativ sind (hintere commissure (pc), fornix (f), fasciculus retroflexus (fr), mammillothalamischer Trakt (mt)).

5 Beispiel 2k zu Abbildung 13)

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im Vorderhirn (2).

10 Paare von Low-Power- und High-Power-Micrographen von zwei angrenzenden Frontalsektionen sind alternativ für VGLUT2 (A-B, E, G) und VGLUT1 (C-D, F, H) gefärbt. Dies zeigt die deutliche Differenz und die teilweise gegenseitige Ausschließlichkeit in der Verteilung, Dichte und Intensität von VGLUT1- und VGLUT2-Immunoreaktivität (ir) im Neocortex (Lamina IV, VI) Caudate Putamen (CPu), Globulus pallidum (GP), piriform cortex (Pir), Nukleus accumbens Kern (AcC), Nukleus accumbens Rand (AcSh), ventralem Pallidum (VP), olfaktorischem Tuberkel (Tu), Inseln von Calleja (ICj), dem ventralen diagonalen Band (VDB) und dem lateralen Septum (LS). Im CPu ist VGLUT1 etwas schwächer vertreten als VGLUT2. VGLUT2 ist im Globus pallidum (GP) vorhanden (B), wo VGLUT1 fast vollständig fehlt (D). Im piriformen Cortex (Pir) und den Inseln von Calleja (ICj) ist die punktförmige VGLUT1-ir stärker und dichter als für VGLUT2-ir. Zu beachten ist die Akkumulation schwacher bis moderater VGLUT1-ir in den pyramidalen Zellschichten in (E), wo VGLUT2-ir fast völlig fehlt (F). Zu beachten ist auch eine gewisse Überlappung und Reziprozität in der Färbung von VGLUT1 und VGLUT2 in den ICj (G,H) wie auch die Abwesenheit von VGLUT1-ir und VGLUT2-ir im commissuralem Faser-Trakten /Corpus callosum (cc), vordere commissure (ac).

Balken in A, C = 1mm, in B, D = 500 µm; in E-H = 200 µm.

30 Beispiel 2l zu Abbildung 14)

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im thalamischen und hypothalamischen Nucleus.

Angrenzende frontale Sektionen (A,B) des Diencephalons zeigen die nukleus-spezifische differentielle starke Vorkommen von VGLUT2 (A) und VGLUT1 (B) im Thalamus und Hypothalamus. Zu beachten ist das sehr starke Vorkommen von VGLUT2-ir (A) im paraventriculären thalamischen Nucleus (PVA), reunienten thalamischen Nucleus (Re), reticularen thalamischen Nucleus (Rt), paracentralem thalamischen Nucleus (PC) und anterodorsalem thalamischen Nucleus (AD). Hier fehlt VGLUT1-ir (B) fast vollständig oder kommt nur in niedriger Konzentration vor. VGLUT1 (B) kommt moderat im hinteren thalamischen Nucleus (PT) vor, wo VGLUT2 (A) selten ist. VGLUT1 ist fehlt fast völlig in der stria medullaris (sm), wo VGLUT2-ir selten ist.

Angrenzende frontale Abschnitte C, D des Diencephalons zeigen die Häufigkeit von VGLUT2 (C) im vorderen hypothalamischen Nucleus (AH) aber die Seltenheit im paraventriculären Nucleus (PVN) und extreme Seltenheit von VGLUT1-ir im vorderen hypothalamischen Nucleus (AH) und völliges Fehlen im PVN. Zu beachten ist auch die Gegenwart von VGLUT1 (D) im Gegensatz zur Abwesenheit von VGLUT2 (C) im ventromedialen thalamischen Nucleus (VM) und dem Reunions thalamischen Nucleus (Re).

Angrenzende frontale Sektionen des Hypothalamus (E,F) zeigen die Häufigkeit von VGLUT2 im LH, im ventromedialen thalamischen Nucleus (VHM) und dem dorsomedialen thalamischen Nucleus (DM) und die Seltenheit von VGLUT1 im Kern des VMH aber moderates Vorkommen in seinem Rand. Zu beachten ist die schwache Färbung von VGLUT2 in der medianen Eminenz (ME). VGLUT1 und VGLUT2 fehlen in den Fasertrakten des Fornix (f) und des mammillothalamischen Traktes (mt). Dritter ventrikel (3V); Balken = 500 µm (für A-F).

Beispiel 2m zu Abbildung 15)

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im Epithalamus.

- 5 High-Power-Micrographen von angrenzenden Sektionen, die alternativ für VGLUT2 (A) und VGLUT1 (B) gefärbt sind, zeigen den Überfluß an VGLUT2 in sowohl dem medialen habenularen Nukleus (MHb) und dem lateralen habenularen Nukleus (LHb). Es ist zu beachten, daß VGLUT1-ir im MHb weniger dicht ist als VGLUT2-ir. CGLUT1 fehlt fast vollständig im LHb.

10

Balken = 100 µm (für A,B).

Beispiel 2n zu Abbildung 16)

- 15 Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1, Tyrosin-Hydroxylase und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im Mesencephalon und Metathalamus.

Low-Power- (A,C,E) und High-Power-Micrographen (B,D,F) von drei angrenzenden Sektionen sind alternierend für Tyrosin-Hydroxylase (TH), VGLUT2 und VGLUT1 gefärbt und zeigen die differentielle Verteilung, Dichte und Intensität der Immunfärbung für VGLUT1 und VGLUT2 im Vergleich zu TH. VGLUT2-ir Punkte sind im Tectum konzentriert, wobei die höchsten Mengen in der superficialen „Grey“-Schicht des oberen Colliculus (SuG) und geringere Mengen in der intermediären „Grey“-Schicht des oberen Colliculus (InG) zu finden sind, während diese in der optischen Nukleus-Schicht des oberen Colliculus (Op) selten sind. VGLUT2-ir Punkte liegen im gesamten Tegmentum inclusive des Nukleus ruber (R) und der TH-positiven pars compacta der substantia nigra (SNC) vor und sind im dorsalen periaquäductalem Grey (PAG) besonders angereichert und insbesondere im medialen terminalen Nukleus des „accessory optic tract“ (MT), des optischen Zugangstrakts, wie auch im mediocaudalen Teil des

20

25

30

lateralen hinteren Nukleus (LPMC), im hinteren intralaminaren thalamischen Nukleus (PIL) im peripeduncularen Nukleus (PP) und im suprageniculaten thalamischen Nukleus (SG). VGKUT1-ir ist hier minimal. VGLUT 1-Färbung zeigt sich in moderaten Mengen im ventralen medialen geniculaten Nukleus (MGV), wo VGLUT2-Mengen minimal sind. VGLUT1 ist im gesamten Tectum, dem periaquaeductalem Grey und dem tegmentum nur minimal vorhanden und fehlt fast vollständig in der substantia nigra pars compacta (SNC) und der pars reticularis (SNR). Schwache VGLUT2-Färbung ist in den neuronalen Perikarya und Puncta in der SNR vorhanden (D, high-powered Micrograph aus der durch ein Rechteck gekennzeichneten in (C), wo VGLUT1 fast vollständig fehlt (korrespondierend in F)). Mesencephalischer Aquaedukt (Aq.)

Balken in A, C, E = 1mm; in B, D, F = 200 µm.

15 **Beispiel 2o zu Abbildung 17)**

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im pontomedullären Hirnstamm.

Low-Power- und High-Power-Micrographen von zwei angrenzenden Frontalsektionen sind alternierend für VGLUT2 (A-D) und VGLUT1 (E-H) gefärbt. Dies zeigt eine starke Menge punktförmiger VGLUT2-Immunoreaktivität (ir) (B, D) in der medialen oberen Olive (MSO), wo VGLUT1-ir niedrig ist (F, H). VGLUT2-ir ist relativ schwach im Nukleus des trapezoiden Körpers (TZ) (B-C) ausgeprägt, wo VGLUT1-ir in großer Menge vorliegt (F-G). Es ist zu beachten, daß deutlich VGLUT1-positive confluyente große Punkte immunonegative neuronale Zellkörper im TZ (G) umschließen. Starke VGLUT1-ir-Punkte sind in den zentralen sensorischen Nukleus des trigeminal Nervs (Pr5), wo VGLUT2-ir sehr niedrig ist. Moderat positive VGLUT1 Punkte sind in dem motorischen trigeminalen Nukleus (Mo5) vorhanden, wo VGLUT2-ir niedrig ist. VGLUT1-ir und VGLUT2-ir sind mit geringer Menge im lateralen medialen parabrachialen

Nukleus vertreten (LPB, MPB). Moderate VGLUT2-ir akkumuliert im locus coeruleus (LC), wo VGLUT1-ir sehr gering ist. VGLUT1-ir und VGLUT2-ir fehlen im pyramidalen Trakt (pyr). Angrenzende Sektoren (I,J) alternierend für VGLUT2 (I) und VGLUT1 (J) gefärbt, zeigen eine starke Menge punktförmiger VGLUT1-Immunoreaktivität (ir) im vorderen ventralen cochlearen Nukleus (VCA), wo VGLUT2 im Prinzip völlig fehlt. Ein High-Power-Micrograph (K) von J zeigt stark positive VGLUT-ir Punkte, die immunonegative neuronale Zellkörper und Prozesse einschliessen. VGLUT1-ir Punkte sind in größerer Zahl im dorsalen cochlearen Nukleus (DC) als VGLUT2-ir-positive Punkte.

Balken in A, E = 500 µm; in B, F, I, J = 200 µm; in C, D, G, H, K = 25 µm.

Beispiel 2p zu Abbildung 18)

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im unteren Hirnstamm.

Low-Power- und High-Power-Micrographen von zwei angrenzenden Frontalsektionen sind alternierend für VGLUT2 (A, C, E, G) und VGLUT1 (B, D, F, H) gefärbt, zeigen eine moderate Menge kleiner punktförmiger VGLUT2-Immunoreaktivität (ir) im oberflächlichen spinalen trigeminalen Nukleus (Sp5), was durch Pfeile markiert ist (A, G), wo VGLUT1-ir im Prinzip völlig fehlt (Pfeile in B, H). VGLUT2 ist im dorsalen motorischen Nukleus des Vagus (10), hypoglossalen Nukleus (12), der retikularen Formation (Rt) und im ventralen Teil des solitären Traktes (SolV) (A,C,E,) moderat vorhanden, wo VGLUT1 im Prinzip völlig fehlt (B, D, F). VGLUT2-ir ist im dorsalen solitären Trakt (SolD) sehr niedrig. Zu beachten ist das Übergewicht VGLUT1 im tiefen Sp5 (B, F, H), im Cuneat (Cu) und dem grazen Nukleus (GR), wo VGLUT2-ir niedrig ist. Sterne markieren den zentralen Kanal.

Balken in A, B = 500 µm; C,D = 200 µm, E,F = 100 µm; G,H = 100 µm.

Beispiel 2q zu Abbildung 19)

Dies ist ein Vergleich zwischen VGLUT1 und VGLUT2 bezüglich der Verteilung im Cerebellum.

Low-Power- und High-Power-Micrographen von zwei angrenzenden Frontalsektionen, alternierend für VGLUT2 (A, B) und VGLUT1 (C, D) gefärbt, zeigen eine extreme Dichte intensiv gefärbter VGLUT1-positiver Punkte in der molekularen Schicht (m), sehr wenige VGLUT1 Punkte um Somata der Purkinje Zelle in der Purkinje Zellschicht (p) und dichte glomeruli-ähnliche Akkumulation stark gefärbter konfluenter VGLUT1 Punkte in der granularen Schicht (g). VGLUT2-ir Punkte sind viel weniger dicht in der molekularen Schicht, wo Sie in einer bandförmigen Art angeordnet sind. VGLUT2-ir Punkte, die glomerula-ähnliche Strukturen in der glomerularen Schicht (g) bilden, sind weniger dicht als die, die für VGLUT1 färben.

Balken in A, C = 500 µm; in B,D = 100 µm.

Diskussion und Analyse zu Beispiel 2 allgemein:

Die differentielle Verteilung von BNPI und DNPI in Synapsen des primärafferenten, spinalen trigeminalen und supraspinalen Systems ist eine starke Evidenz für eine selektive Beeinflussbarkeit sensorischer Funktionen durch selektive Modulation des DNPI bzw. BNPI-vermittelten Glutamat-Transports.

Die Präsenz von BNPI und DNP im DRG weist auf die Möglichkeit hin, periphere neurogene Entzündungen selektiv durch selektive Intervention am DNPI oder BNPI-Target zu beeinflussen. Die Präsenz im DRG indiziert auch eine immunmodulatorische Rolle und entsprechende Targetierung. Eine Präsenz von BNPI und DNPI im sensorischen Vagus oder

Glossopharyngeus Ganglion indiziert das Target für Baroafferenz, Chemoafferenz, cardiovaskuläre oder cardiorespiratorische Funktion, inklusive Asthma, Hypertonie etc., wie auch für Emesis. Interessant ist die Verteilung auch für die Darm-Gehirn-Achse, also Regulation der Sättigung, der „Inflammatory bowel disease“ oder Morbus Crohn ebenso wie für Autoimmunität im zentralen oder peripheren Nervensystem, autoimmuner Diabetes, alkoholischer Neuropathie, Alkohol induzierter chronischer Pankreatitis mit Neuroproliferation (Fink et al. mit Weihe; Neuroscience). Alleine die Verteilung im ZNS und PNS macht diese Targets zu interessanten Objekten in den restlichen bereits oben genannten Indikationen.

Ein entscheidender Punkt war aber auch, daß BNPI und DNPI in den afferenten Bereichen zu den sensorischen Bereichen des Auges und des Ohres nachgewiesen werden konnten, was in Kombination mit den anderen Erkenntnissen eine wichtige Rolle bei Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Katarakt, Netzhautablösung, Retinadegeneration, Glaukom oder Nystagmus oder Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans oder Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn nahelegt.

Entscheidend ist weiter, daß die Verteilung von VGLUT2 in den meisten Regionen des Gehirns und des Rückenmarks komplementär und gegenseitig ausschließend zur Expression von VGLUT1 ist. Zusammen könnten die beiden Glutamat-Transporter für die Aufnahme von Glutamat durch synaptische Vesikel aller centralen glutamatergen Neuronen verantwortlich sein.

Es wurde hier gefunden, daß die thalamischen und Gehirnstamm-Relais-

Zentren des visuellen und statoakustischen Pfades durch differentielle VGLUT1- und VGLUT2- gesteuerte Signale getrieben werden. Thalamische und mesencephalische Relay-Zentren des visuellen Systems wie der colliculus superior und der dorsolaterale geniculate Nukleus und der mediale terminale Nukleus des „Accessory optic tracts“, des zugehörigen optischen Systems sind spezifisch VGLUT2-gesteuert, was nahelegt, daß die retinalen ganglionischen Zellen, die das dritte Neuron des optischen Sinnes repräsentieren, zumindest teilweise mit VGLUT2 beschichtet sind. Im Gegensatz dazu erhalten der Hirnstamm cochlear, olivary trapezoid und das metathalamische mediale geniculate Relay-Zentrum des Gehör-Pfades starken Input von VGLUT1-beschichteten glutamatergen Synapsen.

Verschiedene Nuklei des Gehirnstamm visuellen Systems erhalten einen starken Input durch VGLUT2 synaptische Punkte. Daher scheint der Gehirnstamm des optischen Systems ausschließlich durch VGLUT2 glutamaterge Synapsen versorgt zu werden.

Es ergeben sich folgende Ergebnisse und Folgerungen aus den Untersuchungen: DNPI ist ein neuer Marker für glutamaterge synaptische Vesikel, wobei es 2 unterschiedliche Typen von Neuronen, bzw. Synapsen gibt. VGLUT1 und VGLUT2 zeigen ein differentielles Verteilungsmuster.

Insgesamt läßt sich aus der Verteilung der BNPI und DNPI im ZNS und PNS zeigen, daß diese eine Rolle bei den verschiedenen bereits oben genannten Indikationen spielen, für die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren an diesen Targets ansetzende arzneilich wirksame Verbindungen gesucht werden.

Beispiel 3:

Durchführung des Screeningverfahrens mit Messung der Bindung über die Verdrängung eines radioaktiv markierten Liganden

Ein Nukleinsäureabschnitt, der für BNPI kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine konstitutive Expression (z.B. CMV-

Promoter) oder eine induzierbare Expression in eukaryonten Zellen erlaubt. Die DNA wird mit geeignetem Transfektionsverfahren, z.B. mit Lipofectamin (Fa. Roche Diagnostics) in eukaryontischen Zellen (z.B. CHO-Zellen, HEK293-Zellen oder NIH-3T3-Zellen) hineingebracht. Die Zellen werden in Anwesenheit eines Selektionsreagenzen (z.B. Zeocin, Hygromycin oder Neomycin) kultiviert so daß nur die Zellen überleben, die das DNA-Konstrukt aufgenommen haben, und bei länger andauernder Selektion, auch in das Genom inkorporiert haben.

Ausgehend von diesen Zellen werden Membranfraktionen gewonnen, die BNPI in großer Menge enthalten und für einen Bindungsassay verwendet werden können. Dieser besteht aus 1.) dem BNPI enthaltenden Membranen 2.) einem radioaktiv markierten Liganden 3.) einem Bindungspuffer (z.B. 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA) und dem auf Bindung zu untersuchenden Liganden. Nach Inkubation der oben genannten Reaktionsgemische (für z.B. 30-60 min) bei einer geeigneten Temperatur (meistens Raumtemperatur) werden die nichtgebundenen radioaktiven Ligandenmoleküle abfiltriert. Die Restmenge an gebundenem Liganden wird nach Zugabe eines Szintillationscocktails in einem β -Counter (z.B. Trilux, Fa. Wallac) vermessen. Zeigt die Testsubstanz eine Bindung an BNPI, so wird dies als verringerter radioaktiver Einbau detektiert. Dieses Verfahren wird geeignetermaßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels eines Roboters im sogenannten Highthroughput-Screening (HTS)-Verfahren durchzuführen.

Beispiel 4:

Durchführung des erfindungsgemäßen Screeningverfahrens mit BNPI und Messung der durch die Bindung der Substanz veränderten funktionellen Parameter

Ein Nukleinsäureabschnitt, der für BNPI kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine induzierbare Expression in Prokaryonten, wie z.B. E.coli erlaubt. Hierbei wird der Nukleinsäureabschnitt so modifiziert, daß er als Fusionsprotein mit einer zusätzlichen N- oder C-terminalen Aminosäuresequenz exprimiert wird. Diese Sequenz sollte bei unveränderter Funktion des BNPI eine Aufreinigung über ein spezifisches Verfahren erlauben, z.B. Glutathion S-Transferasefragment, das über Bindung an Glutathion eine Isolierung aus dem Proteingemisch erlaubt. Nach Transfektion der Bakterien, Induktion des Genes (z.B. mit IPTG beim lac-Promoter) und Aufschließen der Bakterien werden die Fusionsproteine aufgereinigt und in einem in vitro-Kinase Experiment eingesetzt. Hierbei werden 5 µg Protein bei 30°C für 30 Minuten in 50 µl Kinasepuffer (20 mM PIPES, pH 7.0, 5 mM MnCl₂, 7 mM β-Mercaptoethanol, 0.4 mM Spermin, 10 mM rATP) ergänzt mit 10 µCi [γ -³²P] ATP. Als Substrate werden gereinigtes Histon H1-Protein (Fa. Sigma) oder bakteriell exprimiertes GST-NFATc1-Fusionsprotein hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wird das nicht-inkorpierte [γ -³²P] ATP abfiltriert und die Menge an eingebautem ³²Phosphat durch β-Szintillation (Trilux, Fa. Wallac) bestimmt. In einem Experiment zum Aufspüren neuer BNPI-Inhibitoren werden in diesem Ansatz die Testsubstanzen mitinkubiert und eine Abnahme der ³²P-Inkorporation als Indikator für einen Inhibitor benutzt. Dieses Verfahren wird geeignetermaßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels eines Roboters im sogenannten Highthroughput-Screening (HTS)-Verfahren durchzuführen.

Beispiel 5:

Durchführung des erfindungsgemäßen Screeningverfahrens mit DNPI und Messung der durch die Bindung der Substanz veränderten funktionellen Parameter

Das Verfahren wird wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, daß statt eines Nukleinsäureabschnitt, der für BNPI kodiert, ein Nukleinsäureabschnitt eingesetzt wurde, der für DNPI kodiert.

5

Beispiel 6:

Beispiel für ein Arzneimittel zur Tinitus-Behandlung enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung - Tablettenformulierung

10

Tabletten können durch direktes Verpressen von Mischungen der erfindungsgemäßen Verbindung mit entsprechenden Hilfsstoffen oder durch Verpressen von verbindungshaltigen Granulaten (mit gegebenenfalls weiteren Hilfsstoffen) hergestellt werden. Die Granulate können dabei entweder durch Feuchtgranulation mit z.B. wäßrigen Granulierflüssigkeiten und anschließender Trocknung dieser Granulate oder durch Trockengranulation z.B. über Kompaktierung hergestellt werden.

15

■ Direktverpressung

20

z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
	271 mg	Ludipress TM (Granulat zur Direkttablettierung aus Lactose monohydrat, Povidon K30 und Crospovidon)
	4 mg	Magnesiumstearat
	300 mg	Gesamt

25

30

Homogene Mischung des Wirkstoffes mit den Hilfsstoffen herstellen und diese auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 10 mm verpressen.

▪ Trockengranulation

5	z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
		166 mg	Microcristalline Cellulose
		80 mg	Niedrig substituierte Hydroxypropylcellulose (I-HPC LH 11 TM)
		5 mg	Hochdisperses Siliziumdioxid
		4 mg	Magnesiumstearat
10		280 mg	Gesamt

15 Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und der I-HPC herstellen und diese Kopaktieren. Nach dem Sieben der Komprimat wird das entstandene Granulat mit Magnesiumstearat und Siliziumdioxid gemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 9 mm verpreßt.

20 ▪ Feuchtgranulation

25	z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
		205 mg	Mikrokristalline Cellulose
		6 mg	Povidon K30
		10 mg	Crospovidon
		4 mg	Magnesiumstearat
		250 mg	Gesamt

30 Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und dem Crospovidon herstellen und diese in einem Granulator mit einer wäßrigen Lösung des Povidons granulieren. Das feuchte Granulat wird anschließend nachgranuliert und nach

der Trocknung im Trockenschrank (50°C) 10 h getrocknet. Das trockene Granulat wird mit dem Magnesiumstearat zusammen gesiebt, endgemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem \varnothing von 8 mm verpreßt.

5

Beispiel 7:

Beispiel für ein Arzneimittel zur Tinitus-Behandlung enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung – parenterale Lösung

10


1 g einer erfindungsgemäßen Verbindung wird in 1 l Wasser für Injektionszwecke bei Raumtemperatur gelöst und anschließend durch Zugabe von NaCl (Natriumchlorid) auf isotone Bedingungen eingestellt.

Literatur:

5 Aihara Y, Mashima H. Onda H. Hisano Setsuji, Kasuya H., Hori T. Yamada S., Tomura H. Yamada Y., Inoue I., Kojima I. und Takeda J. (2000), J. Neurochem. 74: 2622 - 2625


Akopian AN, Sivilotti L & Wood JN (1995) Nature 379: 257-262

Ausubel FM, Brent R, Kingdon RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K eds.(1990) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.

10  Baba H, Doubell TP, Woolf CJ 1999: Peripheral inflammation facilitates A β fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. J Neurosci 19: 859-867

15 Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P & Strauss M (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) Nucl Acids Res 21: 4272-4280.

Bonini A, Anderson SM, Steiner DF (1997) Molecular cloning and tissue expression of a novel orphan G Protein-coupled receptor from rat lung. Biochem Biophys Res Comm 234: 190-193.

20  Chih-Cheng et al., (1995): A P2X prinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. Nature 377:428-432

Corderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993): Contribution of central plasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. Pain 52: 259-285.

25 Dickenson (1995) Novel pharmacological targets in the treatment of pain. Pain Rev., 2, 1-12.

Dubuisson et al., 1997 Pain, 4:161-174.

Feng Y & Gregor P (1997) Cloning of a novel member of the G Protein-coupled receptor family related to peptide receptors. Biochem Biophys Res Comm 231: 651-654.

Furukawa T, Yang Y, Nakamoto B, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T (1996): Identification of new genes expressed in a human erythroleukemia cell line. *Bloods Cell Mol & Dis* 22:11-22.

5 Gunasekar PG, Kanthasamy, AG, Borowitz JL, Isom GE 1995: NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65: 2016-2021.

10 Hawes BE, Fried S, Yao X, Weig B, Graziano MP 1998: Nociceptin (ORL1) and μ -Opioid receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation in CHO cells through a Gi-coupled signaling pathway: evidence for distinct mechanisms of agonist-mediated desensitization. *J Neurochem* 71: 1024-1033.

15 Hubank M & Schatz DG (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* 22: 5640-5648.

Klußmann S et al., 1996: *Nature Biotechnology* 14: 1112-1115.

Li L-Y & Chang K-J 1996: The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in chinese hamster ovary cells transfected to express μ -opioid receptors. *Mol Pharm* 50:599-602.

20 Liang P & Pardee AB 1992: Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.

25 Methner A, Hermey G, Schinke B, Hermanns-Borgmeyer I (1997): A novel G Protein-coupled receptor with homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development. *Biochem Biophys Res Comm* 233: 336-342.

Mohit AA, Martin JH & Miller CA 1995: p493F12 Kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron* 14: 67-78.

Poirier GM-C, Pyati J, Wan JS, Erlander MG 1997: Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Research* 25: 913-914.

5 Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG & Danna KJ 1995: Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Research* 23: 4738-4739.

10 Tal M 1996: A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful neuropathy. *Neuroreport* 7: 1382-1384.

Tölle TR (1997): Chronischer Schmerz. In: *Klinische Neurobiologie*, Herdergen T, Tölle TR, Bähr M (Hrsg.): S. 307-336; Spektrum Verlag, Heidelberg.

15 U.S.Patent 5.262.311

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.

Wan JS, Sharp JS et al. (1996): Cloning differentially expressed mRNAs *Nature Biotech* 14:1685-1691.

20 Watson JB & Margulies JE (1993) Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. *Dev Neurosci* 15: 77-86.

25 Wilks AF (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1603-1607.

WO96/34288

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE 1992: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.

Zimmermann, M & Herdegen, T (1996): Plasticity of the nervous system at the systemic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. *Progr Brain Res* 110: 233-259

Patentansprüche

1. Verfahren zur Auffindung pharmazeutisch relevanter Substanzen mit
Wirksamkeit in den Indikationen oder zur Behandlung von

5

10

15

20

25

30

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie; Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung, Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums, cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder

Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen; Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation, neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation, Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress, Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-Restaurant-Syndrom, Aggression, Paranoia, Hirnerschütterung, neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus oder mit Wirksamkeit zur Förderung der Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der Kognition oder des Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur Liquordiagnostik neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

mit folgenden Verfahrensschritten:

- (a) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten Bedingungen mit mindestens einem Biomolekül aus Gruppe I: dem Protein BNPI und/oder DNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu

mindestens 90 % ähnlichen Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder deren Antisense Polynukleotide bindet, oder einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens eines der vorgenannten Proteine und Teilproteine, bzw. Biomoleküle, synthetisiert hat,

(b) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem oder den von der Zelle synthetisierten Protein/en und/oder Teilprotein/en oder Messung mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz an das oder die Protein/e und/oder Teilprotein/e, bzw. Biomolekül/e veränderten funktionellen Parameter.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter erlaubt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reportergen eingeführt wird.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle gentechnisch so manipuliert wird, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise zu mindestens 95 %, insbesondere zu mindestens 97 % ähnliches Polynukleotid enthält.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation gemäß Anspruch 2 und vor dem Schritt (a) gemäß Anspruch 1 unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden des Teilproteins und/oder Proteins und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz erfolgt.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfolgt, insbesondere über Messung

der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger.

- 5 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem ein erstes Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 mit einem zweiten Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 derart gekoppelt wird, daß die Meßwerte und Ergebnisse des ersten Verfahrens hinsichtlich der zu messenden Substanz mit den Meßwerten und
- 10 Ergebnissen des zweiten Verfahrens hinsichtlich der zu messenden Substanz verglichen werden, dadurch gekennzeichnet, daß in einem der zwei Verfahren, im folgenden Hauptverfahren genannt, im Schritt (a) die zu testende Substanz

15 entweder

mit einem Biomolekül aus Gruppe II: dem Protein BNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu

20 mindestens 90 % ähnlichen Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnlichen Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer

25 der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet, oder einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens

30 eines der vorgenannten Proteine und/oder Teilproteine synthetisiert hat,

oder

mit einem Biomolekül aus Gruppe III: dem Protein DNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 2b) oder 2d) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a) oder 2c) oder deren Antisense Polynukleotide bindet, oder einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens eines der vorgenannten Proteine und/oder Teilproteine synthetisiert hat, inkubiert wird,

und

daß im anderen der zwei Verfahren, im folgenden Nebenverfahren genannt, im Schritt (a) die zu testende Substanz mit einem Biomolekül aus der Gruppe I oder mit einem Biomolekül aus derjenigen Gruppe ausgewählt aus Gruppe II und Gruppe III inkubiert wird, aus der das Biomolekül, mit der die Substanz im Hauptverfahren inkubiert wird, nicht ausgewählt ist.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die aufzufindenden Substanzen ausgewählt sind aus:

Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur
Behandlung von Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus
Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz
amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation,
Obesitas, Morbus Parkinson, Katarakt, Virus-Infektionen oder
bakterielle Infektionen, diabetische Neuropathie, autoimmuner
Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids;
Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung,
Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans,
Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn,
Schlafstörungen, Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug
insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder
Kokain; Neuroinflammation, Insomnia, zur adjuvanten Therapie
per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

vorzugsweise

Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur
Behandlung von Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus
Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz
amyotrophe Lateralsklerose, Gewichtsregulation, Obesitas,
Katarakt, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen,
Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung,
Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans,
Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn,
Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei
Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain;
Neuroinflammation

insbesondere

Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur Behandlung von Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Katarakt, Netzhautablösung, Retinadegeneration, Glaukom oder Nystagmus

5

und/oder

Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans oder Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn.

10

13. Verbindung identifizierbar durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 als pharmazeutisch relevante Substanz mit Wirksamkeit in mindestens einer der Indikationen gemäß Anspruch 1 oder 12.

15

14. Verbindung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine niedermolekulare Verbindung ist.

15. Verwendung

20

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise zu wenigstens 95%, insbesondere zu wenigstens 97% oder genau entspricht,

25

- b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist,

30

spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

5 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,

10 d. von BNPI und/oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 15 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, 20 vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, 25 hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

30 e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),

- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14 und/oder
- h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) bindet,

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere

glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration
 insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie;
 Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung,
 Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung
 5 insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom,
 Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums,
 cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen
 des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder
 Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder
 10 Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des
 Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-
 Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen;
 Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol,
 Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit
 15 Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation,
 neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des
 spinalen Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien,
 Erkrankungen der Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien,
 Neuroinflammation, Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder
 20 Fieber, Stress, Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien,
 Chinese-Restaurant-Syndrom, Aggression, Paranoia,
 Hirnerschütterung, neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom,
 cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale Apoptose,
 Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-
 25 Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt,
 Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen
 der Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus oder mit
 Wirksamkeit zur Förderung der Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der
 Kognition oder des Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur
 30 Liquordiagnostik neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten
 Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei
 Parkinson.

16. Verwendung

- 5 a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise zu wenigstens 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 10 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 15 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- 20 f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)
- 25
- 30

zur Herstellung eines Arzneimittels zum Einsatz in der Gentherapie.

17. Verwendung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt.

18. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Arzneimittel mit Wirksamkeit in der Indikation oder zur Behandlung von

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie; Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung, Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums, cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen

des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen; Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation, neurotoxisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation, Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress, Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-Restaurant-Syndrom, Aggression, Paranoia, Hirnerschütterung, neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus oder mit Wirksamkeit zur Förderung der Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der Kognition oder des Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur Liquordiagnostik neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

handelt.

19. Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids,

vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

5 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

10 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,

15 d. von BNPI und/oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20

Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e),
- g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14 und/oder
- h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) bindet,

zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose eines Zustands ausgewählt aus

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Erbrechen, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis,

Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie; Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung, Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums, cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen; Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation, neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation, Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress, Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-Restaurant-Syndrom, Aggression, Paranoia, Hirnerschütterung, neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom,

cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus.

20. Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- d. von BNPI und/oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens

90 %, vorzugsweise mindestens 95%, insbesondere mindestens 97% ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)

in einem Verfahren zur Auffindung pharmazeutisch relevanter Substanzen mit Wirksamkeit in den Indikationen oder zur Behandlung von

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Schizophrenie, Manien, Depression, Schlaganfall, Hirntrauma, Querschnittslähmung, amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Anorexia nervosa, Epilepsie, Hemibalismus, Chorea Huntington, Stress, Morbus Parkinson, TIA (Transiente Ischämische Attacken), Emesis, insbesondere Hyperemesis beispielsweise bei

Chemotherapie, Schwindel, in jeglicher Form, Katarakt, Arthritis, Hyperaktivität, Entwicklungsstörungen, Tollwut, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Grippe, Malaria, Creutzfeld-Jacob, Inflammatory Bowel disease, Morbus Crohn, kardiovaskuläre und cardiorespiratorische Funktionsstörungen, Hypertonie, Störungen der Baroafferenz oder Chemoafferenz, Toxoplasmose, Asthma, Autoimmunität im zentralen und peripheren Nervensystem, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Störungen des autonomen Nervensystems, Störungen des Nervensystems des Verdauungstraktes, Übererregbarkeit, insbesondere glutamatvermittelte Übererregbarkeit, Neurodegeneration insbesondere bei Morbus Alzheimer, Morbus Alzheimer, Ischämie; Encephalitis insbesondere virale oder bakterielle; Prionerkrankung, Rasmussen-Encephalitis, HIV-Encephalitis, Demyelinisierung insbesondere bei multipler Sklerose, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Cerebellums, cerebelläre Ataxie, Erkrankungen der Basalganglien, Erkrankungen des Pallidums, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Störungen des Gedächtnisses, Störungen des Lernens, Störungen der Kognition, Stiff-Man-Syndrom, Restless Leg-Syndrom, Angstzustände, Phobien, Schlafstörungen; Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Hepatoencephalopathie mit Alkoholintoxikation, Hepatoencephalopathie ohne Alkoholintoxikation, neurotoxikologisch bedingte Erkrankungen, Erkrankungen des spinalen Motoneurons, Muskelatrophien, Muskeldystrophien, Erkrankungen der Hinterstrangbahnen, alkoholische Neuropathien, Neuroinflammation, Befindlichkeitsstörungen bei Infektionen oder Fieber, Stress, Geschmacksstörungen, Nahrungsmittelallergien, Chinese-

Restaurant-Syndrom, Agression, Paranoia, Hirnerschütterung, neuroendokrine Störungen, Tourette-Syndrom, cerebrovaskuläre Spasmen, neuronale Apoptose, Neurodegeneration, neuronale Nekrose, Astrocytose, Burn-out-Syndrom, Sudden-Infant-Death (plötzlicher Kindstod), Herzinfarkt, Insomnia, retrograde Amnesie, multiple Sklerose, Jet-lag, Störungen der Sexualfunktion, wie Impotenz oder Priapismus oder mit Wirksamkeit zur Förderung der Mikrogliaaktivierung, des Lernens, der Kognition oder des Gedächtnisses, zur Neuroprotektion, zur Liquordiagnostik neurostatistischer Erkrankungen oder zur adjuvanten Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson.

21. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 15, 18, 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Indikation oder die zu behandelnde oder zu diagnostizierende Krankheit ausgewählt ist aus

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz amyotrophe Lateralsklerose, Neuralgie, Gewichtsregulation, Obesitas, Morbus Parkinson, Katarakt, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, diabetische Neuropathie, autoimmuner Diabetes, alkoholische Neuropathie, HIV-Neuro-Aids; Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Schlafstörungen, Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Neuroinflammation, Insomnia, zur adjuvanten Therapie per Elektrostimulation des Nucleus subthalamicus bei Parkinson

vorzugsweise

5

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz amyotrophe Lateralsklerose, Gewichtsregulation, Obesitas, Katarakt, Virus-Infektionen oder bakterielle Infektionen, Retinadegeneration, Glaukom, Nystagmus, Netzhautablösung, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans, Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn, Drogenabhängigkeit, -sucht und -entzug insbesondere bei Alkohol, Nikotin, Opiaten, Ecstasy oder Kokain; Neuroinflammation

10

insbesondere

15

Sehstörungen, Retinitis pigmentosa, Opticus Degeneration, Katarakt, Netzhautablösung, Retinadegeneration, Glaukom oder Nystagmus
oder

Hörstörungen, Tinnitus, M. Menière, Hörsturz, Erkrankungen des Hör- und/oder Gleichgewichtsorgans oder Erkrankungen der Hörbahn oder Vestibularbahn.

20

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung pharmazeutisch wirksamer Substanzen unter Verwendung von BNPI und/oder DNPI bzw. davon abgeleiteter Biomoleküle und die Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen, an BNPI und/oder DNPI bindender Wirkstoffe, gegen BNPI und/oder DNPI gerichteter Antikörper, von Antisensenukleotiden gegen BNPI und/oder DNPI, oder von BNPI und/oder DNPI bzw. Teilproteinen davon, bzw. entsprechenden Polynukleotiden zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung verschiedener Erkrankungen oder zu Therapie und Diagnostik.

Fig. 1a)

```

ccggcggcag gagcgcgccac catggagttc cgccaggagg agtttcggaa gctagcgggt 60
cgtgctctcg ggaagctgca ccgccttctg gagaagcggc aggaaggcgc ggagacgctg 120
gagctgagtg cggatgggcg cccggtgacc acgcagaccc gggacccgcc ggtgggtggac 180
tgcacctgct tcggcctccc tcgccgtac attatcgcca tcatgagtgg tctgggcttc 240
tgcatacagt ttggcatccg ctgcaacctg ggcgtggcca tcgtctccat ggtcaataac 300
agcacgaccc accgcggggg ccacgtgggtg gtgcagaaag cccagttcag ctgggatcca 360
gagactgtcg gcctcataca cggctccttt ttctggggct acattgtcac tcagattcca 420
ggaggattta tctgtcaaaa atttgcagcc aacagagttt tcggctttgc tattgtggca 480
acatccactc taaacatgct gatccccca gctgcccgcg tccactatgg ctgtgtcatc 540
ttcgtgagga tcttgcaggg gttggtagag ggggtcacat accccgcctg ccatgggatc 600
tggagcaaat gggccccacc cttagaacgg agtcgcctgg cgacgacagc cttttgtggg 660
tcctatgctg gggcggtggg cgcgatgcc ctgcggggg tccttgtgca gtactcagga 720
tggagctctg ttttctacgt ctacggcagc ttccgggatct tctggtacct gttctggctg 780
ctcgtctcct acgagtcccc cgcgctgcac cccagcatct cggaggagga gcgcaagtac 840
atcgaggacg ccatacggaga gagecgcgaaa ctcatgaacc ccctcacgaa gtttagcact 900
ccctggcggc gcttcttcac gtctatgcc gtctatgcc tcatcgtggc caacttctgc 960
cgcagctgga cgttctacct gctgctcatc tcccagcccg cctacttcga agaagtgttc 1020
ggcttcgaga tcagcaaggt aggcctgggt tccgcgctgc cccacctggt catgaccatc 1080
atcgtgcccc tcggcgggcca gatcgcgga ttctctcgga gccgcgcgat catgtccacc 1140
accaacgtgc gcaagttgat gaactgcgga ggcttcggca tggaaagccac gctgctgttg 1200
gtggtcggct actcgactc caagggcggt gccatctcct tcctggctcct agccgtgggc 1260
ttcagcggtc tcgccatctc tgggttcaac gtgaaccacc tggacatagc cccgcgctac 1320
gccagcatcc tcatgggcat ctccaacggc gtgggcacac tgcgggcat ggtgtgcccc 1380
atcatcgtgg gggccatgac taagcacaag actcgggagg agtggcagta cgtgttccta 1440
attgcctccc tgggtgacta tggaggtgtc atcttctacg gggctcttgc ttctggagag 1500
aagcagccgt gggcagagcc tgaggagatg agcgaggaga agtgtggctt cgttggccat 1560
gaccagctgg ctggcagtga cgacagcgaa atggaggatg aggctgagcc cccgggggca 1620
ccccctgcac ccccgccctc ctatggggcc acacacagca catttcagcc ccccaggccc 1680
ccacccccctg tcggggacta ctgaccatgt gcctcccact gaatggcagt ttccaggacc 1740
tccattccac tcatctctgg cctgagtgc agtgtcaagg aaccctgctc ctctctgtcc 1800
tgctcaggg ctaagaagca ctctcccttg ttcccagtg tgtcaaatcc tctttccttc 1860
ccaattgcct ctgaggggta gtgaagctgc agactgacag tttcaaggat acccaaattc 1920
ccctaaaggt tccctctcca cccgttctgc ctcatgggt tcaaatctct cctttcaggg 1980
ctttatttga atggacagtt cgacctctta ctctctcttg tggttttgag gcacccacac 2040
cccccgcttt cctttatctc cagggactct caggctaacc tttgagatca ctgagctccc 2100
atctcctttc agaaaaattc aaggtcctcc tctagaagtt tcaaatctct cccaactctg 2160
ttctgcatct tccagattgg ttaaccaat tactcgtccc cgccattcca gggattgatt 2220
ctcaccagcg tttctgatgg aaaatggcgg tttcaagtcc ccgattccgt gccacttca 2280
catctccctc accagcagat tctgcgaaag caccaaattt ctcaagaccc tcttctccct 2340
agcttagcat aatgtctggg gaaaca

```

Fig. 1b)

1	MEFRQEEFRK	LAGRALGKLH	RLLEKRQEGA	ETLELSADGR	PVTTQTRDPP
51	VVDCTCFGLP	RRYIIAIMSG	LGFCISFGIR	CNLGVAIVSM	VNNSTTHRGG
101	HVVVQKAQFS	WDPETVGLIH	GSFFWGYIVT	QIPGGFICQK	FAANRVFGFA
151	IVATSTLNML	IPSAARVHYG	CVIFVRILQG	LVEGVITYPAC	HGIWSKWAPP
201	LERSRLATTA	FCGSYAGAVV	AMPLAGVLVQ	YSGWSSVFYV	YGSFGIFWYL
251	FWLLVSYESP	ALHPSISEEE	RKYIEDAIGE	SAKLMNPLTK	FSTPWRRFFT
301	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GLVSALPHLV
351	MTIIVPIGGQ	IADFLRSRRI	MSTTNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLVDGYSHS
401	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GFNVNHLDA	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM
451	VCPIIVGAMT	KHKTREEWQY	VFLIASLVHY	GGVIFYGVFA	SGEKQPWAEP
501	EEMSEEKCGF	VGHDQLAGSD	DSEMEDEAEP	PGAPPAPPPS	YGATHSTFQP
551	PRPPPPVRDY				

Fig. 1c)

cgataagctt	gatatcgaat	tccggactct	tgctcgggcg	ccttaaccgc	gcgttcggtt	60
catcccgcag	cgccagttct	gcttaccaaa	agtggcccac	taggcactcg	cattccacgc	120
ccggtccac	gccagcgagc	cggtcttctt	acccatttaa	agtttgagaa	taggttgaga	180
tcgtttcggc	cccaagacct	ctaatacttc	gctttaccgg	ataaaactgc	gtggcggggg	240
tgctcgggt	ctgcgagagc	gccagctatc	ctgaggga	cttcggaggg	aaccagctac	300
tagatgggtc	gattagtctt	tgcacctat	acccaggtcg	gacgaccgat	ttgcacgtca	360
ggaccgctac	ggacctccac	cagagtttcc	tctggcttcg	ccctgcccag	gcgatcggcg	420
ggggggaccc	gcggggtgac	cggcggcagg	agccgccacc	atggagttcc	gccaggagga	480
gtttcggaa	ctagcgggtc	gtgctctcgg	gaagctgcac	cgcttctcgg	agaagcggca	540
ggaaggcgcg	gagacgctgg	agctgagtg	ggatgggcgc	ccggtgacca	cgcagaccgc	600
ggaccgcgcg	gtggtggact	gcacctgctt	cgccctccct	cgccgctaca	ttatcgccat	660
catgagtgg	ctgggcttct	gcatacagctt	tggcatccgc	tgcaacctgg	gcgtggccat	720
cgtctccatg	gtcaataaca	gcacgaccca	ccgcgggggc	cacgtgggtg	tgcaaaaagc	780
ccagttcagc	tgggatccag	agactgtcgg	cctcatacac	ggctcctttt	tctggggcta	840
cattgtcact	cagattccag	gaggatttat	ctgtcaaaaa	tttgcagcca	acagagtttt	900
cggttttgct	attgtggcaa	catccactct	aaacatgctg	atccccctag	ctgcccgcgt	960
tcactatggc	tgtgtcatct	tctgtaggat	cctgcagggg	ttggtagagg	gggtcacata	1020
ccccgcctgc	catgggatct	ggagcaaatg	ggccccaccc	ttagaacgga	gtcgcctggc	1080
gacgacagcc	ttttgtgggt	cctatgctgg	ggcgtgggtc	gcgatgcccc	tcgcccgggt	1140
ccttgtgcag	tactcaggat	ggagctctgt	tttctacgtc	tacggcagct	tcgggatctt	1200
ctggtacctg	ttctggctgc	tctgtctcta	cgagtccccc	gcgctgcacc	ccagcatctc	1260
ggaggaggag	cgcaagtaca	tcgaggagcg	catcggagag	agcgcgaaac	tcatagaacc	1320
cctcacgaag	tttagcactc	cctggcggcg	cttcttcacg	tctatgccag	tctatgccat	1380
catcgtggcc	aaattctgcc	gcagctggac	gttctacctg	ctgctcatct	cccagcccga	1440
ctacttcgaa	gaagtgttcg	gcttcgagat	cagcaaggta	ggcctgggtg	ccgcgctgcc	1500
ccacctgggtc	atgaccatca	tctgtcccat	cggcggccag	atcgcgga	tcctgcggag	1560
ccgcgcgcatc	atgtccacca	ccaacgtgcg	caagttagatg	aactgcggag	gcttcggcat	1620
ggaagccacg	ctgctgttgg	tggtcggcta	ctcgactcc	aaggcggtgg	ccatctcctt	1680
cctggctcta	gcccgtgggt	tcagcggctt	cgccatctct	gggttcaacg	tgaaccacct	1740
ggacatagcc	ccgcgctacg	ccagcatcct	catgggcata	tccaacggcg	tgggcacact	1800
gtcgggcatg	gtgtgcccc	tcatacgtggg	ggccatgact	aagcacaaga	ctcgggagga	1860
gtggcagtag	gtgttcctaa	ttgcctccct	gggtgactat	ggaggtgtca	tcttctacgg	1920
ggtctttgct	tctggagaga	agcagccgtg	ggcagagcct	gaggagatga	gcgaggagaa	1980
gtgtggcttc	gttggccatg	accagctggc	tggcagtgac	gacagcgaaa	tggaggatga	2040
ggctgagccc	ccgggggcac	ccctgcacc	ccgcctctcc	tatggggcca	cacacagcac	2100
atttcagccc	cccaggcccc	cacccctgt	ccgggactac	tgaccatgtg	cctcccactg	2160
aatggcagtt	tccaggacct	ccattccact	catctctggc	ctgagtgaca	gtgtcaagga	2220
acctgctcc	tctctgtcct	gcctcaggcc	taagaagcac	tctcccttgt	tcccagtgtc	2280
gtcaaatcct	ctttccttcc	caattgcctc	tcaggggtag	tgaagctgca	gactgacagt	2340
ttcaaggata	cccaaattcc	cctaaagggt	ccctctccac	ccgttctgcc	tcagtgggtt	2400
caaatctctc	ctttcagggc	tttatttgaa	tggacagttc	gacctcttac	tctctcttgt	2460
ggttttgagg	caccacacac	ccccgcttcc	ctttatctcc	agggactctc	aggctaacct	2520
ttgagatcac	tcagctccca	tctcctttca	gaaaaattca	aggctcctcc	ctagaagttt	2580
caaatctctc	ccaactctgt	tctgcactct	ccagattggg	ttaaccaatt	actcgtcccc	2640
gccattccag	ggattgattc	tcaccagcgt	ttctgatgga	aaatggcggg	aattcctgca	2700
gcccggggga	tccact					2716

Fig. 1d)

```
1   MEFRQEEFRK LAGRALGKLH RLLEKRQEGA ETLELSADGR PVTTQTRDPP
51  VVDCTCFGLP RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG
101 HVVVQKAQFS WDPETVGLIH GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA
151 IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG LVEGVITYPAC HGIWSKWAPP
201 LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFYV YGSFGIFWYL
251 FWLLVSYESP ALHPSISEEE RKYIEDAIGE SAKLMNPLTK FSTPWRRFFT
301 SMPVYAIIVA NFCRSWTFYL LLISQPDYFE EVFGFEISKV GLVSALPHLV
351 MTIIVPIGGQ IADFLRSRRI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS
401 KGVAISFLVL AVGFSGFAIS GFNVNHLDA PRYASILMGI SNGVGTLSGM
451 VCPPIVGAMT KHKTREEWQY VFLIASLVHY GGVIFYGVFA SGEKQPWAEP
501 EEMSEEKCGF VGHDQLAGSD DSEMEDEAEP PGAPPAPPPS YGATHSTFQP
551 PRPPPPVRDY
```

Fig. 1e)

```



gaattcggca cgagcggagc tgcggggccg ggccggggccg gggcgggaccc cgggatcccg 60
gacgcggccg cccggggccc cgggcggggg gattggcagg ggacccgcgt gggcacagcc 120
accatggagt tccggcagga ggagtttcgg aagctggcgg ggcgcgccct ggggaggctg 180
caccggttac tggagaagcg gcaggaaggc gcggagacat tggagctgag cggcgacggg 240
cgccagtgga ccacacacac gcgggacccg ccggtggttg actgcacttg ctttggcctc 300
cctcgccgct acatcatcgc gatcatgagc ggtctgggtt tctgcatcag ctttggcatc 360
cgctgcaacc tgggcgtggc catcgtatcc atggtcaaca acagtacaac ccaccgtggg 420
ggccacgtgg tgggtgcagaa agcccagttc aactgggatc cagagactgt cggcctcata 480
catggctcct ttttctgggg gtacattgtc actcagattc ctggaggatt tatctgcaa 540
aaattcgcag ccaacagggt ctttggcttt gccattgttg ctacctccac cctaaatatg 600
ttgatccctt cagcagcccg tgttcactat ggctgtgtca tcttcgtgag gatccttcag 660
ggattggtgg agggggtcac ataccctgct tgccatggca tctggagcaa atgggcccct 720
cccttagaac ggagtcggct ggcgacgaca gccttttgcg gttcctatgc cggggcagtg 780
gttgccatgc ctctggctgg ggtcctggta cagtattcag gatggagttc tgtctctat 840
gtctatggca gcttcgggat cttttggtac ctggttcggg tgcttgtctc ctacgagtca 900
cctgcactac accccagcat ctccgaggag gagcgcaaat acattgagga tgccatcgga 960
gaaagcgcca agctcatgaa cctgtttacg aagtttaaca caccctggag gcgcttcttt 1020
acctccatgc cggctcatgc catcattgtc gccaactttt gccgcagctg gactttctac 1080
ctgctcctca tctcccagcc cgcctacttt gaagaagtgt tcggctttga gatcagcaag 1140
gtgggactgg tgtcggcact gcctcacctt gtcattgacta tcatcgtacc catcggaggc 1200
cagatcgccg acttcctgcg cagtcgtcat ataattgtcca cgaccaatgt gcgaaagctg 1260
atgaactgcg ggggttttcg gatggaagct acgctgctgc tgggtggtcgg atactcacac 1320
tccaagggcg tggccatctc cttcctggtc ctggctgtgg gcttcagtgg ctttgctatc 1380
tctgggttta acgtgaacca cttggacatc gccctcgat atgccagcat cttgatgggc 1440
atttccaatg gcgtgggcac actgtctggg atggtgtgcc ccatcatcgt gggtgcaatg 1500
accaagcaca agacgcggga ggagtggcag tacgtgttcc tcatagcctc cctggtgcac 1560
tatggaggtg tcatcttcta tggggtcttt gcttcgggag agaaacagcc gtgggcagag 1620
cgggaggaga tgagcgagga gaagtgtggc tttgttggcc acgaccagct ggctggcagt 1680
gacgaaagtg aaatggaaga cgaggttgag ccccgggggg cccccccgc acctccgct 1740
tcctacgggg ccacacacag cacagttcag cctccaaggc cccaccccc tgtccgggac 1800
tactgaccac gtgcctccca ctggtgggca gtttccagga cctccactcg atacacctct 1860
agcctaaacg gcagtgtcga ggaacccac tcctctcctg cctcaggctt aagatgcaag 1920
tcttccttg tgcccagtg tgtccgacca gccctctctc cttctcaact gcctcttgca 1980
ggggtgaagc tgcacactag cagtttcaag ctctgcccga attc

```

Fig. 1f)

1	MEFRQEEFRK	LAGRALGRLH	RLLEKRQEGA	ETLELSADGR	PVTTHTRDPP	VVDCTCFGLP
51	RRYIIAIMSG	LGFCISFGIR	CNLGVAIVSM	VNNSTTHRGG	HVVVQKAQFN	WDPETVGLIH
101	GSFFWGYIVT	QIPGGFICQK	FAANRVFGFA	IVATSTLNML	IPSAARVHYG	CVIFVRILQG
151	LVEGVTypAC	HGIWSKWAPP	LEERSRLATTA	FCGSYAGAVV	AMPLAGVLVQ	YSGWSSVFYV
201	YGSFGIFWYL	FWLLVSYESP	ALHPSISEEE	RKYIEDAIGE	SAKLMNPVTK	FNTPWRRFFT
251	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GLVSALPHLV	MTIIVPIGGQ
301	IADFLRSRHI	MSTTNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLVVGYSHS	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS
351	GfNVNHLdia	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPIIVGAMT	KHKTREEWQY	VFLIASLVHY
401	GGVIFYGVFA	SGEKQPWAEF	EEMSEEKCGF	VGHDQLAGSD	ESEMEDEVEP	PGAPPAPPPS
451	YGATHSTVQP	PRPPPPVRDY				

Fig. 2a)

```

cgtttaaaag ccatcagatt tgagagcaat aagtcttcaa aaccgggaat ttacattggt 60
tttcagctga ccgacttcca ggaaaaggac tcaaccgcat ctacccaaat accgtggcac 120
tgcttgcgct ctttgccacc ggatactccc cttccaatga gactttctga ttgtgtctac 180
caactctcct attaggaaac ccgtgggttg catgcagcta ttctgttgta ttctcattct 240
cactctccct cccttctctc actctcactc ttgctggagg cgagccacta ccattctgct 300
gagaaggaaa agcccgaac tactttaaga gattaagaca atatgcgcaa tctcgcctt 360
tcctagcaat cactatttaa atctggcaag aactgacaac agtctttgca agaatggaat 420
ccgtaaaaca aaggattttg gccccaggaa aagaggggct aaagaatttt gctggaaaat 480
cactcggcca gatctacagg gtgctggaga agaagcaaga caccggggag acaatcgagc 540
tgacggagga tgggaagccc ctagagggtg ccgagaggaa ggccgctg tgcgactgca 600
cgtgcttcgg cctgccccgc cgctacatta tcgccatcat gagcggcctg ggcttctgca 660
tctccttcgg tatccgctgc aacctgggcg tggccattgt ggacatggtc aacaacagca 720
ccatccaccg cgggggcaag gtcacaaagg agaaagccaa attcaactgg gaccgggaaa 780
ccgtggggat gatccacggt tccttctttt ggggctacat catcactcag attccgggag 840
gctacatcgc gtctcggctg gcagccaaca gggttttcgg agctgccata cttcttacct 900
ctaccctaaa tatgctaatt ccacagcag ccagagtgc ttatggatgt gtcattcttg 960
tcagaatact gcagggactt gttgaggggt tgacctacc agcatgtcat gggatatgga 1020
gcaaattggg cccacctcta gagaggagta gactggcaac cacctccttt tgtggttcct 1080
atgccggagc tgtgattgca atgcctttag ctggcattct tgtgcagtac actggtctgt 1140
cttcagtgtt ttatgtctac ggaagctttg gaatggtctg gtacatgttt tggcttttgg 1200
tgtcttatga aagtcttgca aagcatccta ctattacaga tgaagaacgt aggtacatag 1260
aagaaagcat tggagagagt gcaaactctt taggtgcaat ggaaaaattc aagactccat 1320
ggaggaagtt ttttacatcc atgccagtc atgcaataat tgttgcaaac ttctgcagaa 1380
gctggacttt ttattttattg cttattagtc agccagcata ttttgaggaa gtctttggat 1440
ttgaaattag caaggttgg atgctatctg ctgtgccaca cttagtaatg acaattattg 1500
tgcctatttg gggacaaatt gcagattttc taagaagcaa gcagattctt tcaactacga 1560
cagtgagaaa gatcatgaat tgtggtggtt ttggcatgga agccacactg ctctggtcgt 1620
ttggctattc tcatactaga ggggtagcaa tctcattctt ggtacttgca gtgggattca 1680
gtggatttgc tatactctgtt ttcaatgtta accacttgga tatcgctcca agatattgcca 1740
gtatcttaat gggcatttctg aatggtgttg gcacattgtc aggaatggtt tgtcctatca 1800
ttgttgggtg aatgacaaag aataagtcac gtgaagagtg gcagtatgtc ttctgatctg 1860
ctgccttagt ccactatggt ggagttatat tttatgcaat atttgccctc ggagagaaac 1920
aaccctgggc agaccggag gaaacaagtg aagaaaaatg tggatttatt catgaagatg 1980
aactcgatga agaaacaggg gacattactc aaaattatat aaattatggt accaccaagt 2040
cttatgggtg cacaacacag gccaatggag gttggcctag tggttgggaa aagaaagagg 2100
aatttgtaca aggagaagta caagactcac atagctataa ggaccgagtt gattattcat 2160
aacaaaacta attactggtt ttatttttag tgtttgtgat taaattcatt gtgattgcac 2220
aaaaatttta aaaacacgtg atgtaaactt gcaagcatat caaccaggca agtcttgctg 2280
taaaaatgaa aacaaaacaa acccatgagg ttaccatcaa gtgcaatctg taaaattgtg 2340
aagttccatc atttccattc aagtcaccca ttcttgcat tgtgacttaa aggttgactg 2400
gtcaaaattg tagaaacaag tagttacca ttggattcat atgagctaaa actcatcact 2460
atttactaaa gcacaacatc tcactctaca aaagttaaga agccaaagct acttgatcat 2520
gcaaaatgca cttatatatt tgttacctg tattgcaaga tagcacacag aagttggctg 2580
cgtcaagtag aggcgacatt tattaagtga aatcatgga gttgggatat ctctcaatta 2640
aagaaataca ttgtgaacta tcagctacaa agttgtactg aataactatt agaattgcat 2700
aatgtgagat attttgtagt tcctcaaaag gaatatcttg cagtgttttc tatgaaatgc 2760
ttgggcacaa acacttattt ctgtgaaaga gaacatgtaa gttgaggggt atgcttcatg 2820
ttcttccatc catttaccta atagtatgaa acagttcaca tttcaataaa atcaaacttt 2880
tcatgtagcg tatcacataa cttttttgca aaaaatataa aaagaaataa acttcaatgt 2940
attttttatt acaactttgt actggttgta acttgcatta gaaaaaaaaa agagatatat 3000
aaaccacaaa gaatctaata agaaatttat tatggagata tagcccttaa aatgcaatat 3060
taagaacaaa gaaatagaaa atggtttaga tatcttctct ccttcataat taaatactat 3120
atgaaacttg tgccacagag ctatatgtaa tatgaaaaga ttaacttcat agagatattg 3180
taagtaggta attttattat ttaaagtcct attaagaaat atttgtctta aatatatagg 3240

```


acaatacatt	atattaaaaat	ggctctctctc	tatatatatc	tgtatatctt	atacatgtcc	3300
atacacagaa	acataataaaa	caatcttcac	acgaaaccaa	aaatagcata	cacctaattgt	3360
tgggttaggg	aattgcaatt	tctactttca	tagagtcata	gaatttttagg	tggggaagag	3420
gcattttgct	tgtcattttct	taatataact	caacaagaat	tgcaacattt	gtgtaccaag	3480
caataagtgc	aatgcataaaa	atttcctgtc	tgtatattac	cttcattttg	cttgtagtag	3540
ctgtttgggt	ggttggaata	attttatttt	tcttttaaaa	aagctaacat	cagaccctt	3600
tataatgtcc	taaaattatg	ataatacatt	tcccaattca	actcaaaata	ttattggtgt	3660
attttgtcta	ttctggatat	ttgatctgtt	taatgtactg	tgctagtgc	tggaggccct	3720
gctactgcaa	atataaaaacc	taaagtttgt	ttaaaaaaat	gcaaatcatt	ctttacctta	3780
agaaaaaaaa	aatacccttt	gctttgtgcc	tcaaagtgat	gtaatgtgat	cacagctttt	3840
gttggtgtga	atgaaaatat	gtggactgtc	attttgttgc	agcaaaaaag	tgттаataaaa	3900
atgctctatt	tatccttttt	taaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa		

Fig. 2 b)

1	MESVKQRILA	PGKEGLKNFA	GKSLGQIYRV	LEKKQDTGET	IELTEDGKPL	EVPERKAPLC
51	DCTCFGLPRR	YIIAIMSGLG	FCISFGIRC	LGVAIVDMVN	NSTIHRGGKV	IKEKAKFNWD
101	PETVGMHGS	FFWGYIITQI	PGGYIASRLA	ANRVFGAAIL	LTSTLNMLIP	SAARVHYGCV
151	IFVRILQGLV	EGVTYPACHG	IWSKWAPPLE	RSRLATTSFC	GSYAGAVIAM	PLAGILVQYT
201	GWSSVFYVYG	SFGMVWYMF	LLVSYESP	AKHPTITDEERR	YIEESIGESA	NLLGAMEKFK
251	TPWRKFFTS	MVYAIIVANF	CRSWTFYLL	LISQPAYFEEV	FGFEISKVGM	LSAVPHLVMT
301	IIVPIGGQIA	DFLRKQILS	TTTVRKIMNC	GGFGMEATLL	LVVGYSHTRG	VAISFLVLAV
351	GFSGFAISGF	NVNHLDIAPR	YASILMGISN	GVGTLSGMVC	PIIVGAMTKN	KSREEWQYVF
401	LIAALVHYGG	VIFYAIFASG	EKQPWADPEE	TSEKCGFIH	EDELDEETGD	ITQNYINYGT
451	TKSYGATTQA	NGGWPSGWEK	KEEFVQGEVQ	DSHSYKDRVD	YS	

Fig. 2c)

```

agacagtaag gttcttttgc ttttttccct tacacaagga ttcgatgaacg ttttttggtca 60
atctgattaa aagacagcgg atttggttgc gttaagactt caaaaccggg aattttacgtt 120
gttttttcggg gaggtgactt ccagaacggg gactcatcag caccgcgcca aataccacgg 180
cactgcgcgc gccctcggcc accggatcct ccccttccaa tgagactttg tgactgtgtg 240
taccaattct cctatttaga aaccctgagg ctgaatgcag ctattccgtt gtactctctt 300
tctcgctctc cctccccctt ccaactcaca gccttgctga aaagctcctc tctgctgaga 360
agaaaacggt ctaccttaac ctattaagac tatgcgcaga actcgccttt catagccatc 420
acaatttaaa tctggtaagg ctggacacga gtctttacaa gaatggagtc ggtaaaacaa 480
aggattttgg ccccggggaa agaggggata aagaattttg ctggaaaatc ctcgggacag 540
atctacaggg tgctggagaa gaagcaggat aaccgagaga ccatcgagct gacagaggac 600
ggcaagcccc tggagggtgc tgagaagaag gctccgctat gcgactgtac gtgcttcggc 660
ctgccgcgcc gctacatcat agccatcatg agcggcctcg gcttctgcat ctcctttggt 720
atccgctgta acctgggtgt ggccattgtg gacatgggtc acaacagcac catccaccgg 780
gggtggcaaa ttatcaagga gaaagccaag tttaactggg acccgagac tgtggggatg 840
attcacgggt cgttcttctg gggctatata atcacgcaga ttccggggcg atacatcgca 900
tcgcgactgg ctgctaaccg ggtctttggg gctgccatac tgcttacctc taccctcaat 960
atgctgatcc catctgcagc cagagtgcac tatggatgag tcatctttgt tagaatattg 1020
caaggacttg tggagggcgt cacctacca gcctgtcacg ggatatggag caagtgggccc 1080
cctccttttg agaggagtag gttggctacc acctccttct gtggttccta tgctggagca 1140
gtcattgcaa tgcccctagc tggatccctg gtgcagtaca ctggatggtc ttcagtattt 1200
tacgtatatg gaagcttttg tatggtctgg tatatgttct ggcttctggg gtcttacgag 1260
agccccgcaa agcatccaac cataacagac gaagaacgta ggtacataga agagagcatc 1320
ggggagagcg caaatctgtt aggagcaatg gagaaattca agaccccatg gaggaagttt 1380
ttcacatcca tgcccgctca tgcgataatt gttgcaaact tctgcaggag ttggactttt 1440
tatttactgc tcatcagtca accagcttat ttcgaggagg tttttggatt tgaaatcagc 1500
aagggttgca tgttgtctgc ggtcccacac ctgggtcatga caatcattgt gcctatcggg 1560
gggcaaattg cagactttct aaggagcaag caaattcttt caacaactac agtgcgaaaag 1620
atcatgaact gcggggggtt tggcatggaa gccacactgc ttctggttgt tggctactct 1680
catactagag ggggtggccat ctcttctctg gtgcttgtag tgggattcag tggatttgct 1740
atctctgggt tcaatgtgaa ccacttggat attgccccga gatatgccag tatcttaatg 1800
ggcatttcaa atggtgttgg cacgctgtcg ggaatgggtc gcccgatcat tgttggtgca 1860
atgacgaaga acaagtcccg tgaagaatgg cagtatgtct tctcatcgc tgcactggtc 1920
cactatgggt gagtcatatt ttatgcacta tttgcctcag gagagaagca accttgggca 1980
gaccctgagg aaacaagcga agaaaagtgt ggcttcattc atgaagatga actggatgaa 2040
gaaacggggg acatcactca gaattacata aattacggta ccaccaaata ctacggcgcc 2100
acctcacagg agaacggagg ctggcctaac ggctgggaga aaaaggaaga atttgtgcaa 2160
gaaagtgcgc aagacgcgta ctctataaag gaccgagatg attattcata acgaagctag 2220
ttgctggatt cttttgtagt gtttgtgatt aaattaattg tgattgcaca aaatcatttt 2280
aagaaatgtg gtgtaaacad gtaaacacat caaccaagca agtcttgctg ttcaaaaaat 2340
aataataata tgaattcaaa acagaccgtg agagtcccat caagtgcaat ctgtggcgcc 2400
agtcacgtga cgccatttcc attcaggcca ttcgtccttt tcgtttgtga tttaaagggt 2460
tcctgtagaa ataagtaggt attcgttgga tccatcacca cgttagagag tacaactaca 2520
acagttggca catgtcatcc tacggaagtt aggaagccaa agctactgga ttatgtgaac 2580
tgcatthatt tattttattac actggactgc aaaatatccc agggaaatcc tgtctagaga 2640
catagtagaa ctggaaagat ggctagattg ggtactgacg ataatcattg tgtgtatatc 2700
atggagtggc tatatctttt aattggagaa ctatattgta tagctagcaa aattgtactg 2760
aattattact aggagtgcac agtgtgtgat attttgtgat cttccaaaag cttatcttgc 2820
agtgttttgt gaaacgcttg ggcacaaaca cttattttta tgaacaagag cttgtaaagg 2880
gaggagtatg ctccatgctc tccatttcac tacctgacag tatcaaacct tcacatttca 2940
atgaaatcca acgtccatgt aacatatcac atgacttttt ttgcaaaaaa gaataataaga 3000
agaaatagac ttcaatgtat tttttattac aactttgtac tggttgtaac ttgcattagg 3060
aaaaatgatt aatatatgta taatcgtaaa gaatctaata aaaatttact atgaagatat 3120
agcccttaaa atgcaatatt aacaacaaaa atatatagaa aatttagata atcttccttg 3180

```

ataactagag	actatatgga	actcacacca	caaagctata	tataatatga	aaagataaac	3240
aatagagatt	gtatatgtag	acgattttat	gacctaatgt	cccattttaag	aggatatttgt	3300
cttgagtata	tagtaciaaag	tatattaaaa	ttatatctac	atccctgtat	atcttatata	3360
tatccactca	cacaaacata	acaaataactt	ttcacacaga	acaaaaaaca	agcatacacc	3420
taatggtggg	tttgggggatt	gcaattttcta	ctttcataga	gtcatagaat	tttagatggg	3480
aaaaaaaaaag	gcatttttgct	cgtcattttct	taatataatt	aattcaacag	gaactgcaac	3540
atgtgtgtac	caagcaataa	gtgcgaagca	taaacctget	gtgtgtaaac	tatccccata	3600
ctgcttgtgg	tagcactgat	ttctttcttt	taaagaactt	aacatcggag	ctcttttaca	3660
tgttttgcgc	tgataagaat	gcacatccca	atttaacgca	aagtgtcacc	tggtgtgttt	3720
acctgtctgt	tttgggtatt	tggtctgttt	ggtgtcctgt	gctcttgact	ggaggccctg	3780
ctactgcgaa	tataaaacgt	gaagtttgtt	tctaaatgca	aaccactcct	gaccttaaga	3840
aactaaagtc	cctctctgct	ttgtgtctcc	aagtactatc	atgtgaccat	aacccttgct	3900
gtgctgagta	aaaagatgtg	aactgtcatt	ttgttgctgc	gaagcaagtg	ttaataaaat	3960
gttctattta	aaaaaaaaaa	aa				

Fig. 2d)

1	MESVKQRILA	PGKEGIKNFA	GKSLGQIYRV	LEKKQDNRET	IELTEDGKPL
51	EVPEKKAPLC	DCTCFGLPRR	YIIAIMSGLG	FCISFGIRC	LGVAIVDMVN
101	NSTIHRGGKV	IKEKAKFNWD	PETVGMIHGS	FFWGYIITQI	PGGYIASRLA
151	ANRVFGAAIL	LTSTLNMLIP	SAARVHYGCV	IFVRILQGLV	EGVTYPACHG
201	IWSKWAPPLE	RSRLATTSC	GSYAGAVIAM	PLAGILVQYT	GWSSVFYVYG
251	SFGMVWYMFV	LLVSYESPAK	HPTITDEERR	YIEESIGESA	NLLGAMEKFK
301	TPWRKFFTS	PVYAIIVANF	CRSWTFYLLL	ISQPAYFEEV	FGFEISKVGM
351	LSAVPHLVMT	IIVPIGGQIA	DFLSKQILS	TTTVRKIMNC	GGFGMEATLL
401	LVVGYSHTRG	VAISFLVLAV	GFSGFAISGF	NVNHLDIAPR	YASILMGISN
451	GVGTLSGMVC	PIIVGAMTKN	KSREEWQYVF	LIAALVHYGG	VIFYALFASG
501	EKQPWADPEE	TSEEKCGFIH	EDELDEETGD	ITQNYINYGT	TKSYGATSQE
551	NGGWPNGWEK	KEEFVQESAQ	DAYSYKDRDD	YS	

FIG 3)

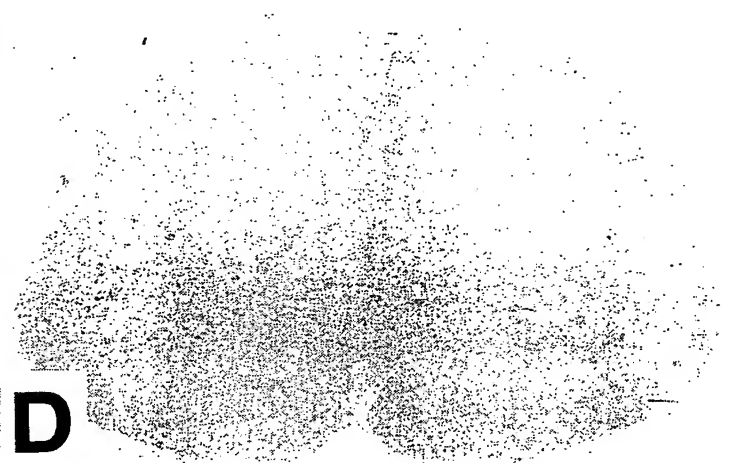
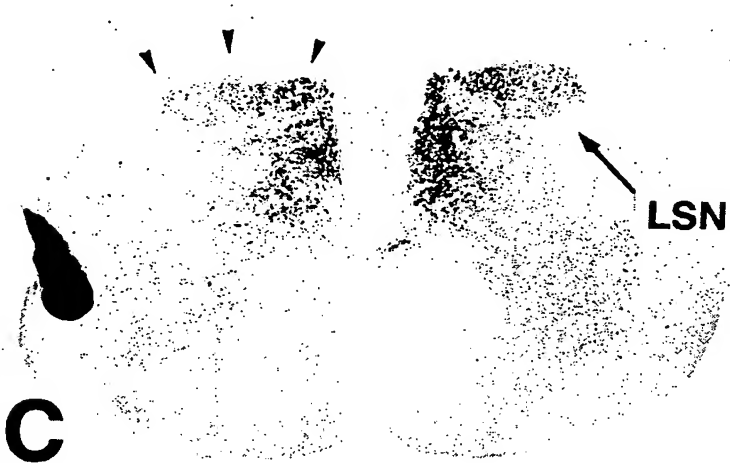
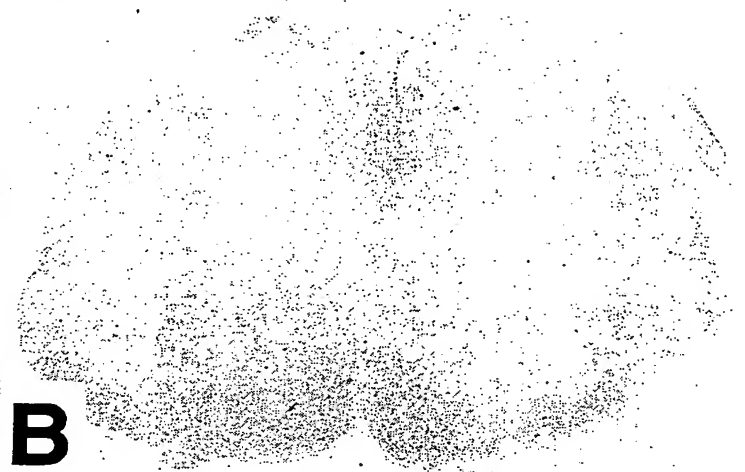
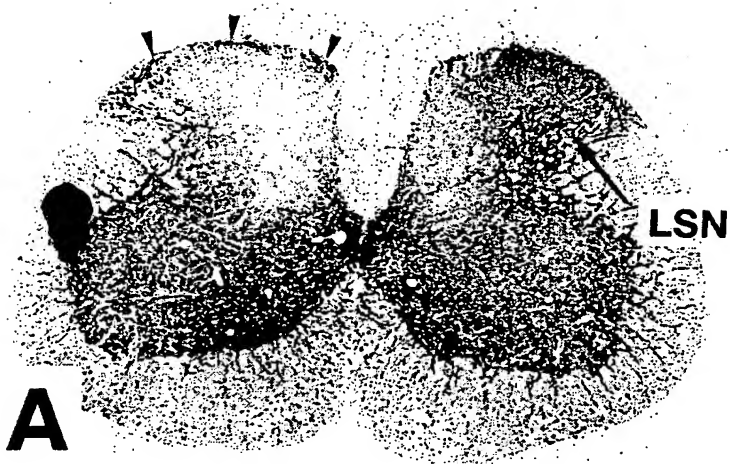
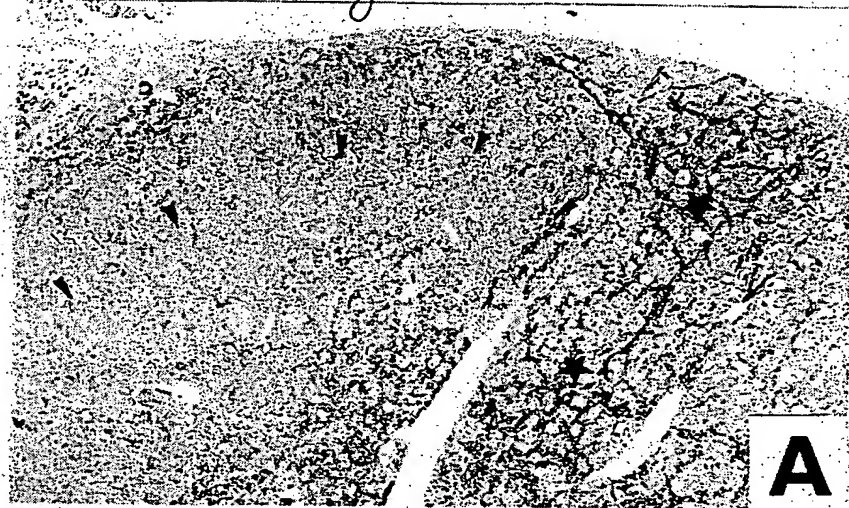


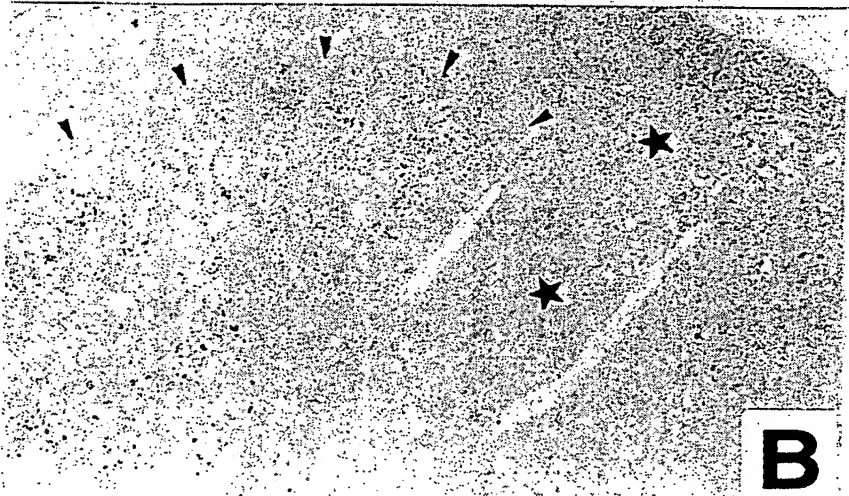
Fig. 4)

DNPI



A

BNPI



B

FIG 5)

BNPI

DNPI

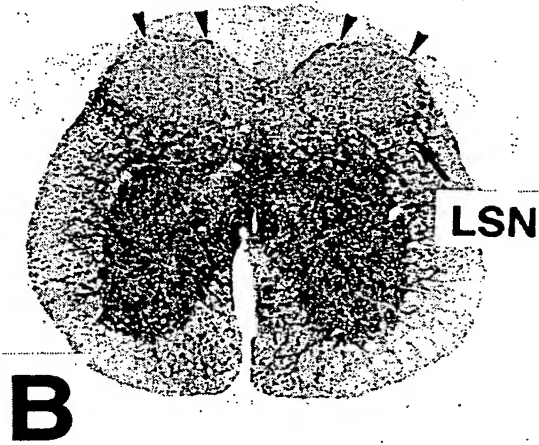
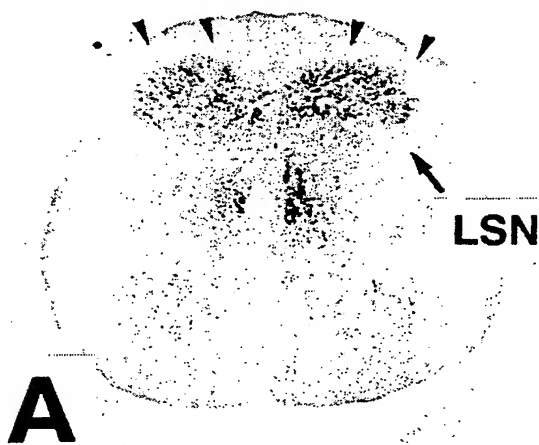


FIG 6)

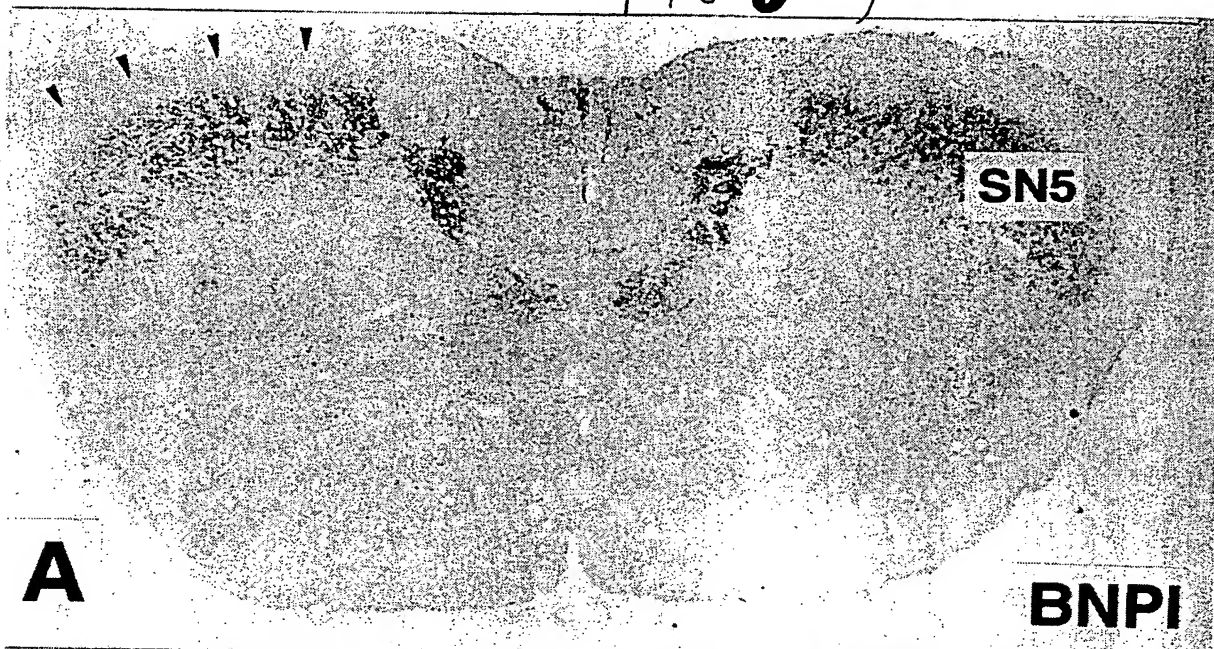


FIG. 7)

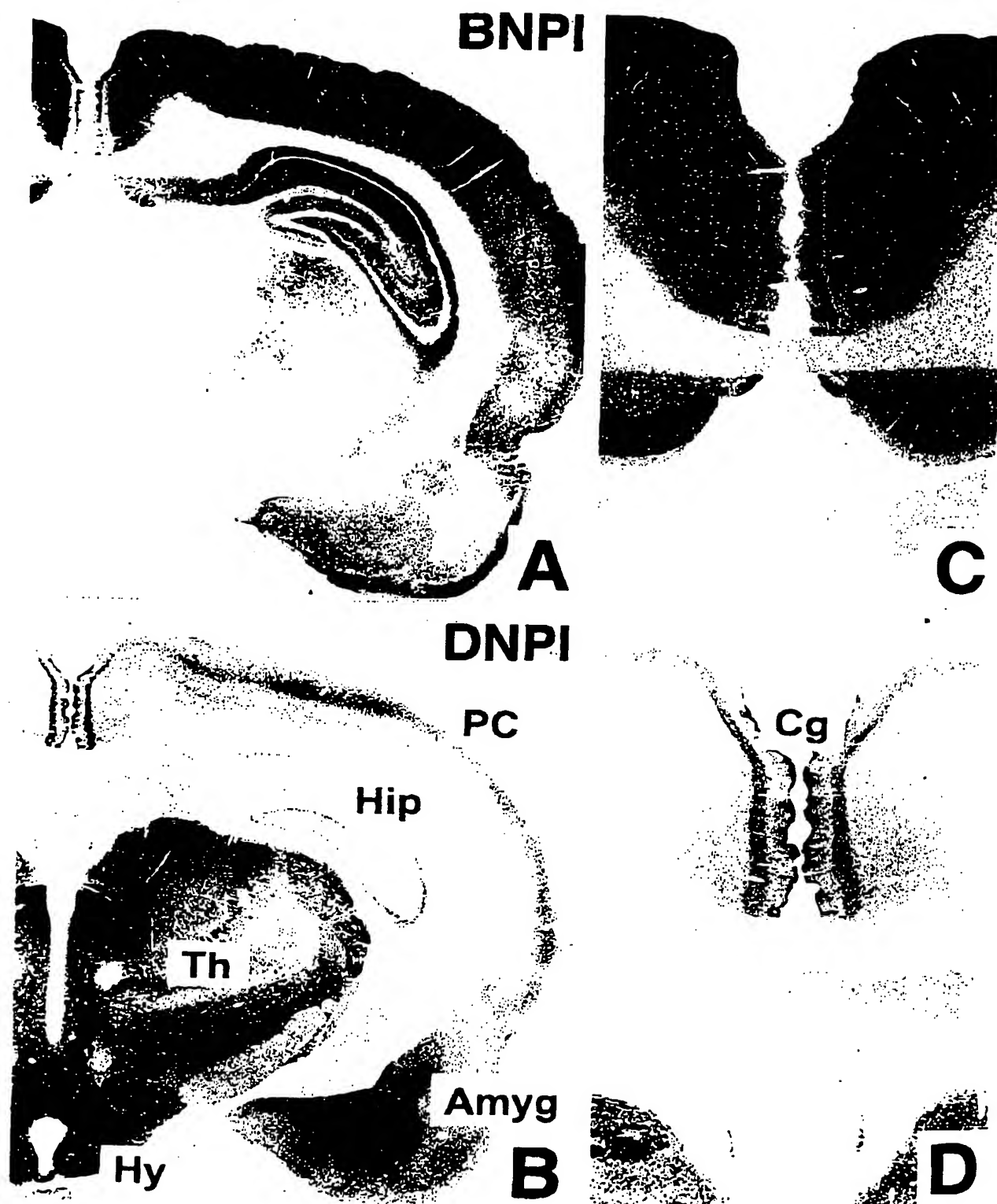
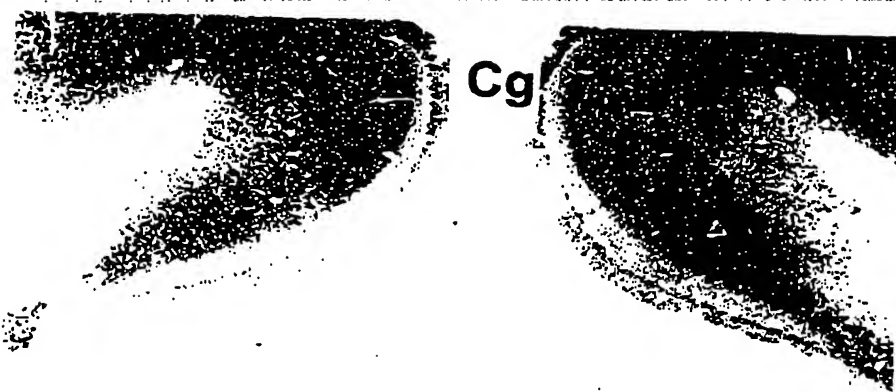
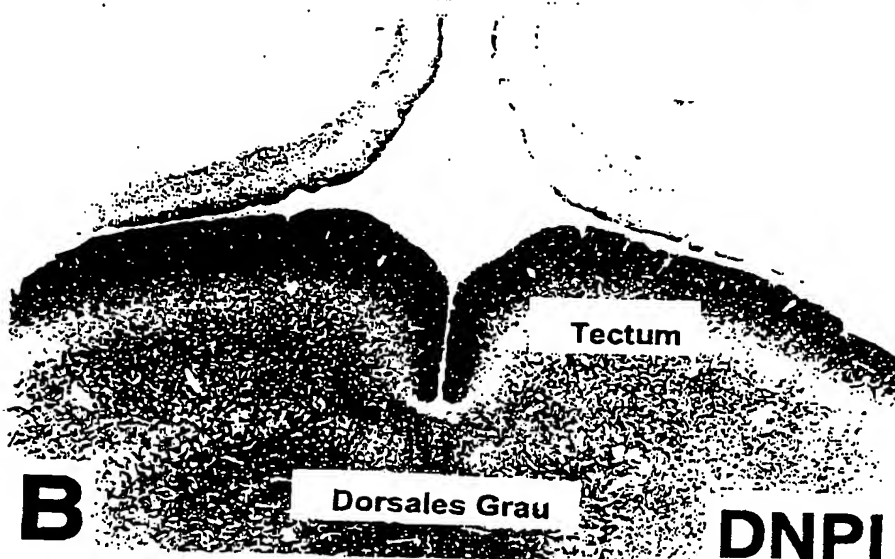


FIG 8)



A

BNPI

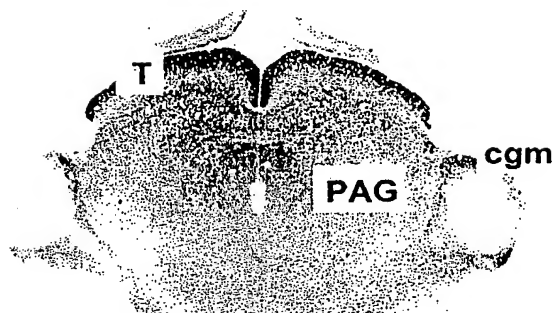


B

DNPI

FIG 9 /

DNPI



BNPI



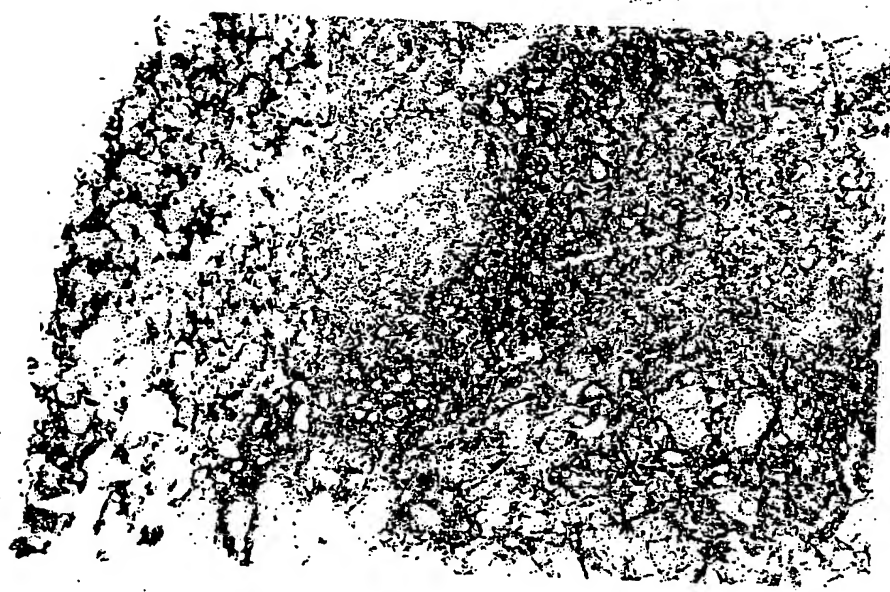
Fig 10)

DNPI



Hb

DNPI



mHb

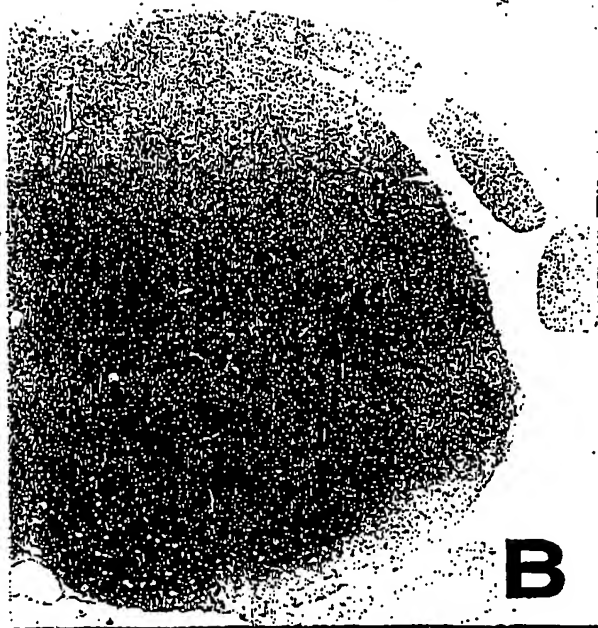
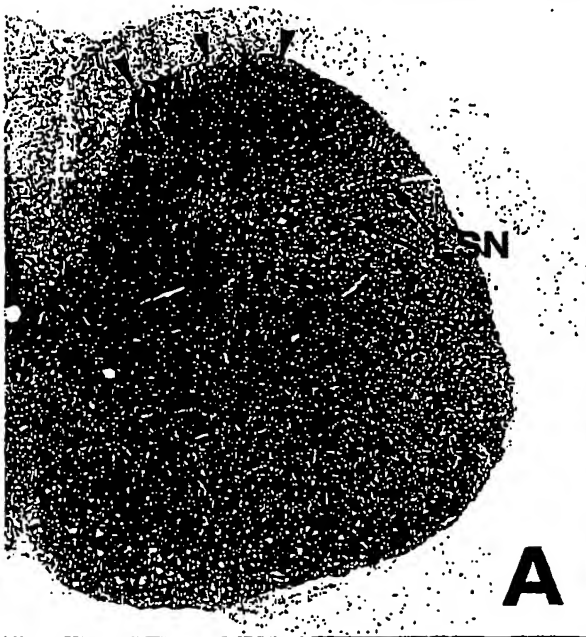


BNPI

FIG 11)

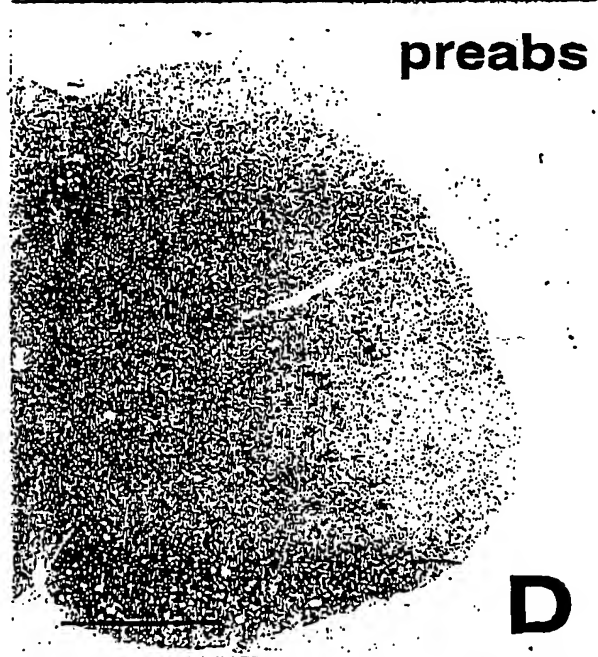
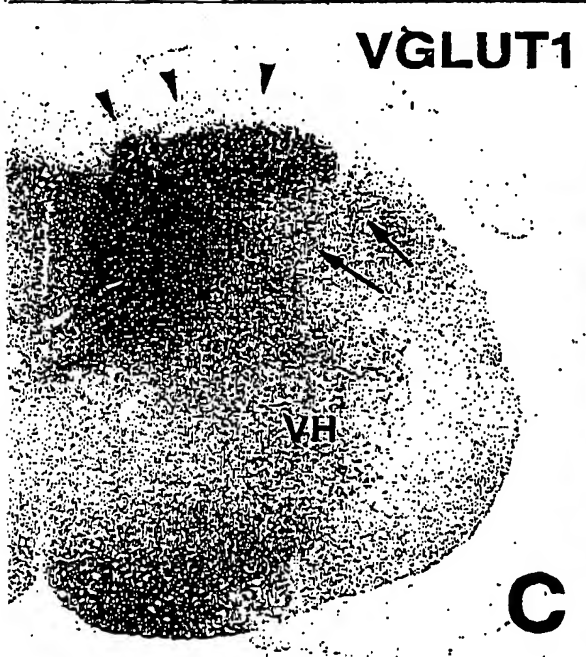
VGLUT2

preabs



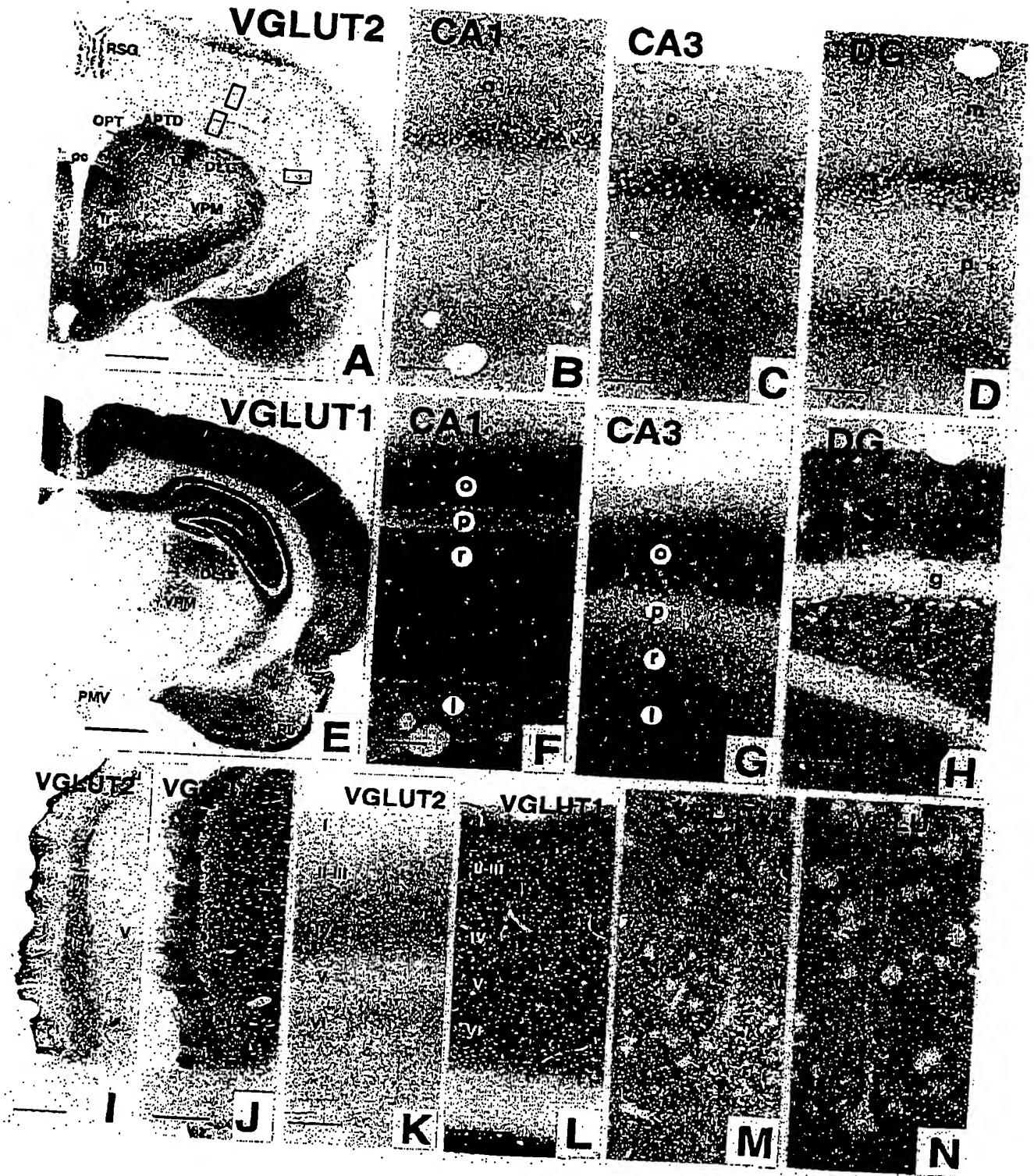
VGLUT1

preabs



un

FIG 12)



am

Fig 13)

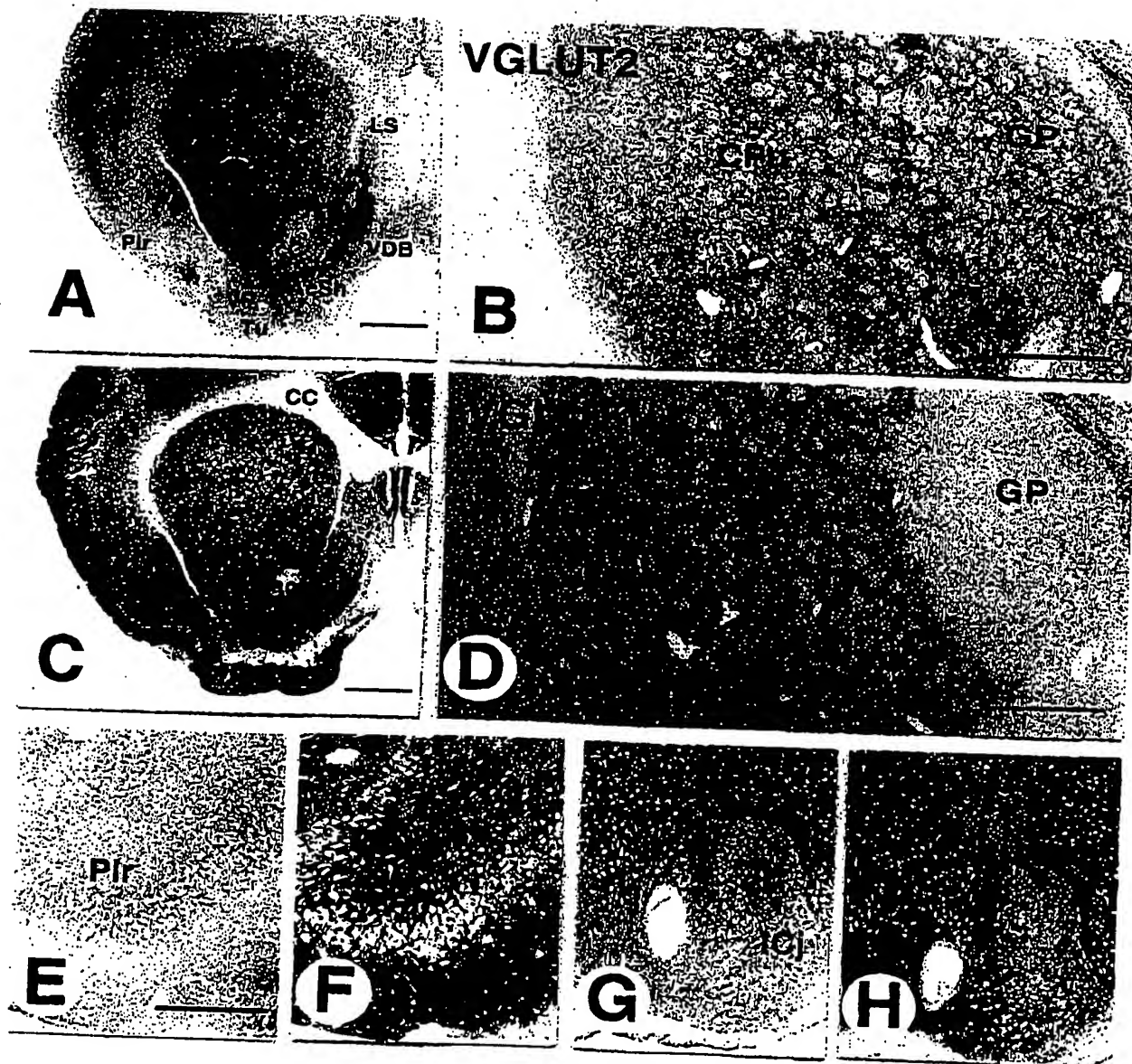


FIG 14)

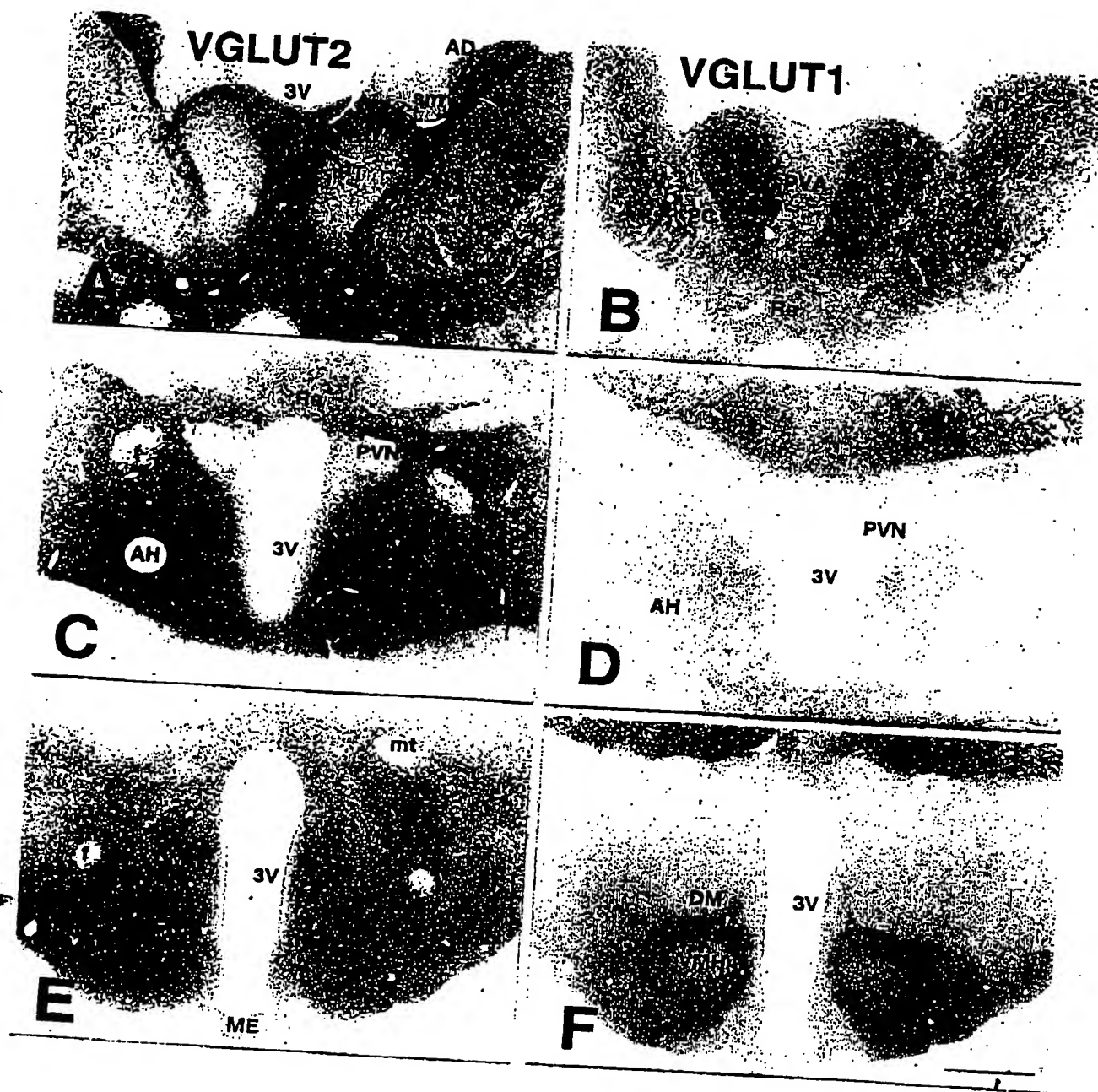
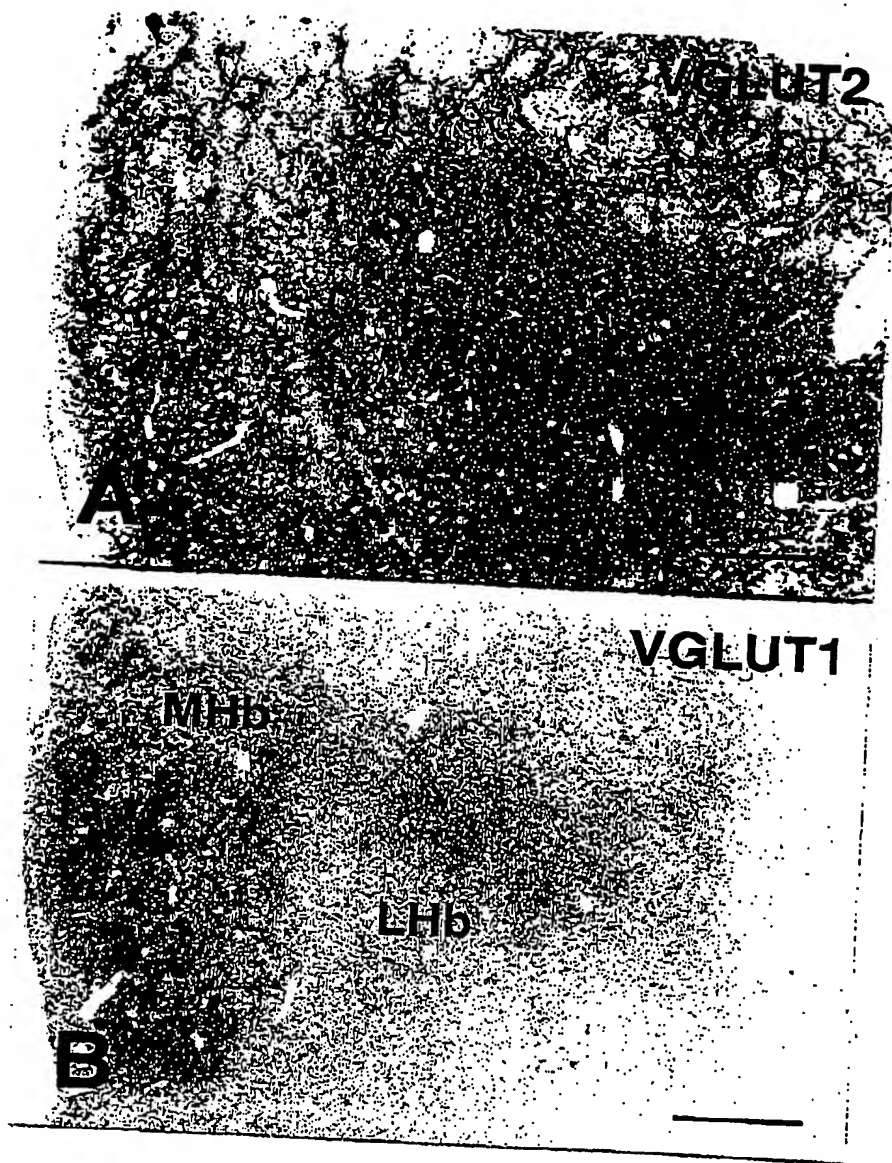
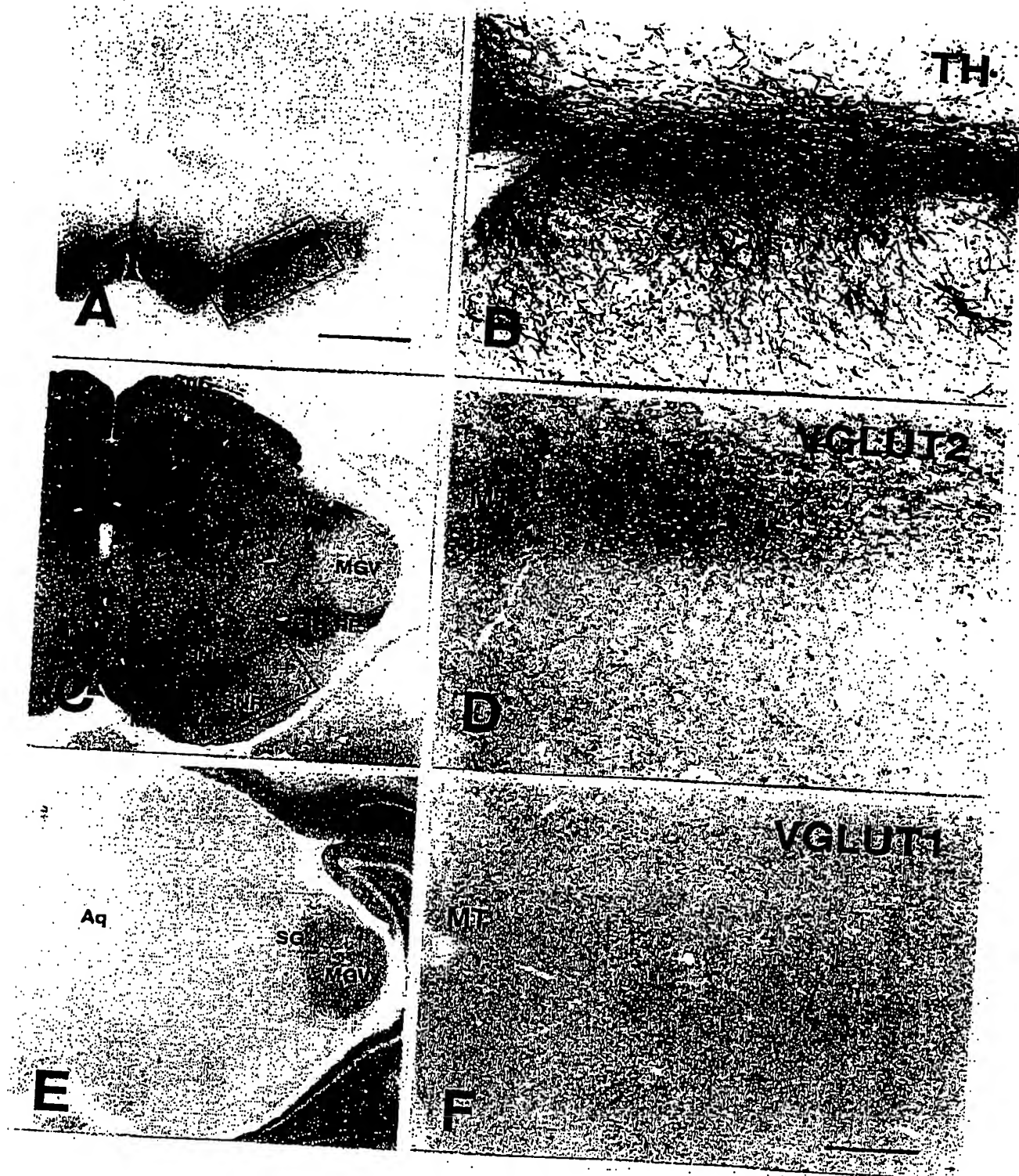


FIG 15)



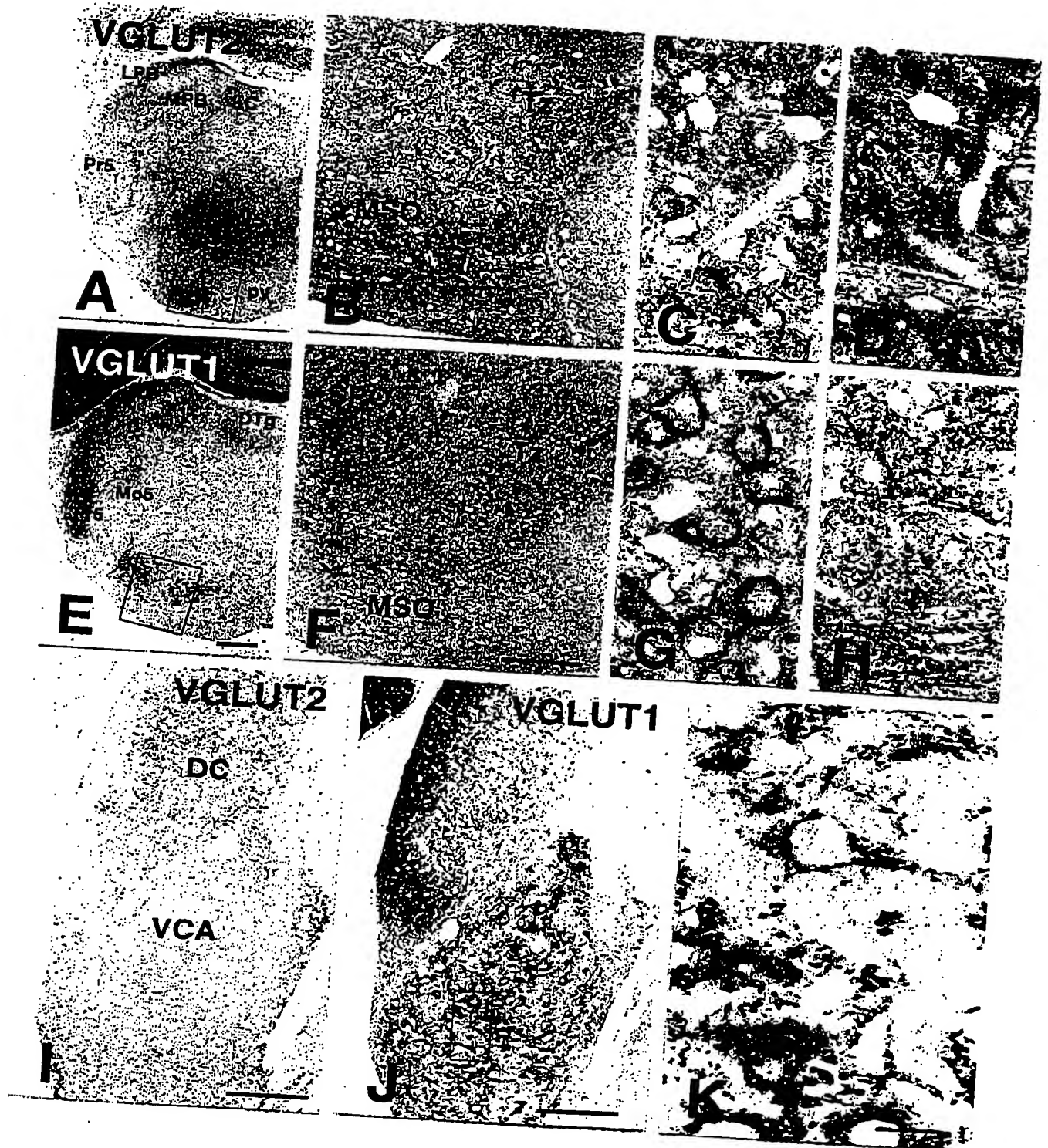
65

Fig 16)



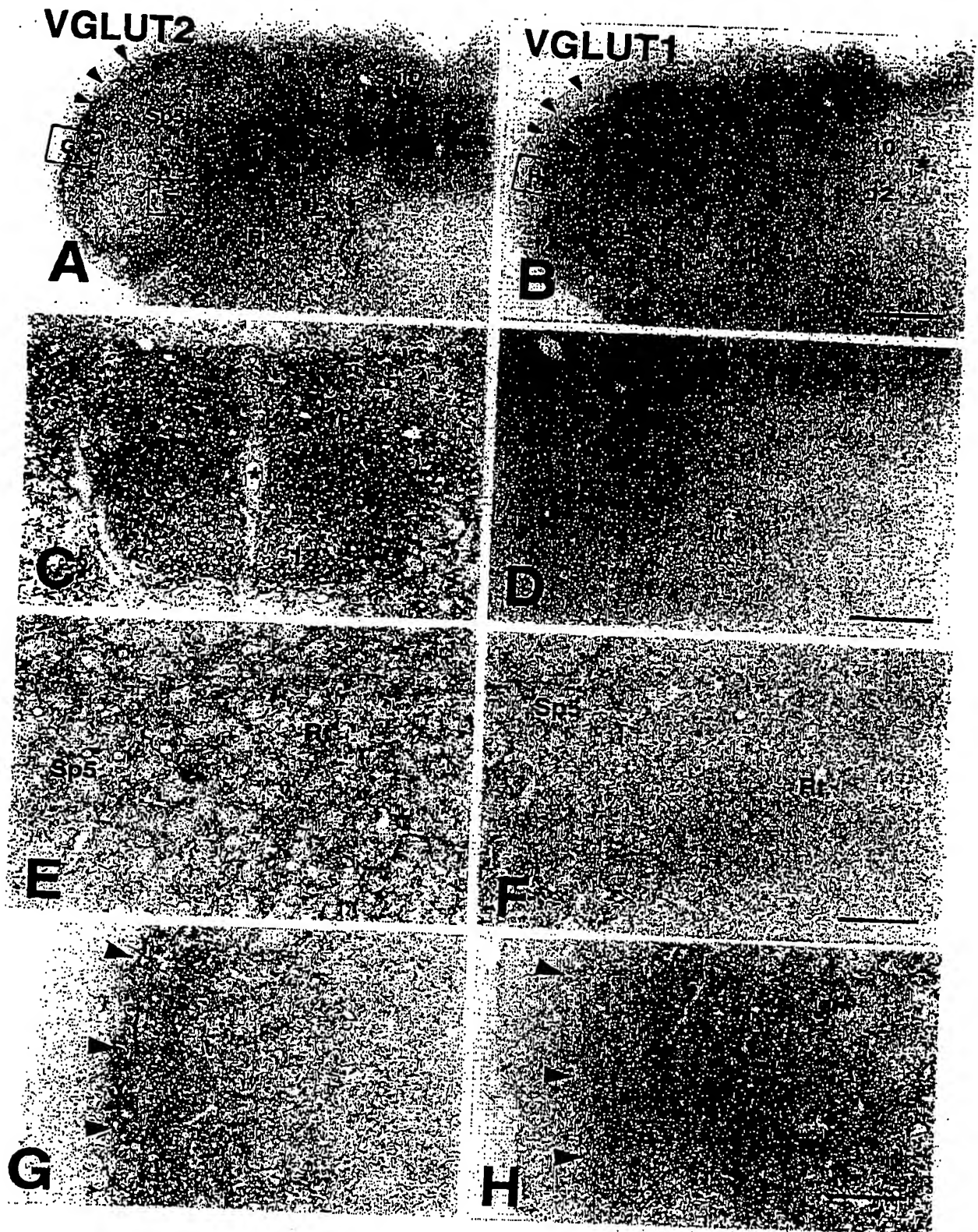
16h

FIG 171



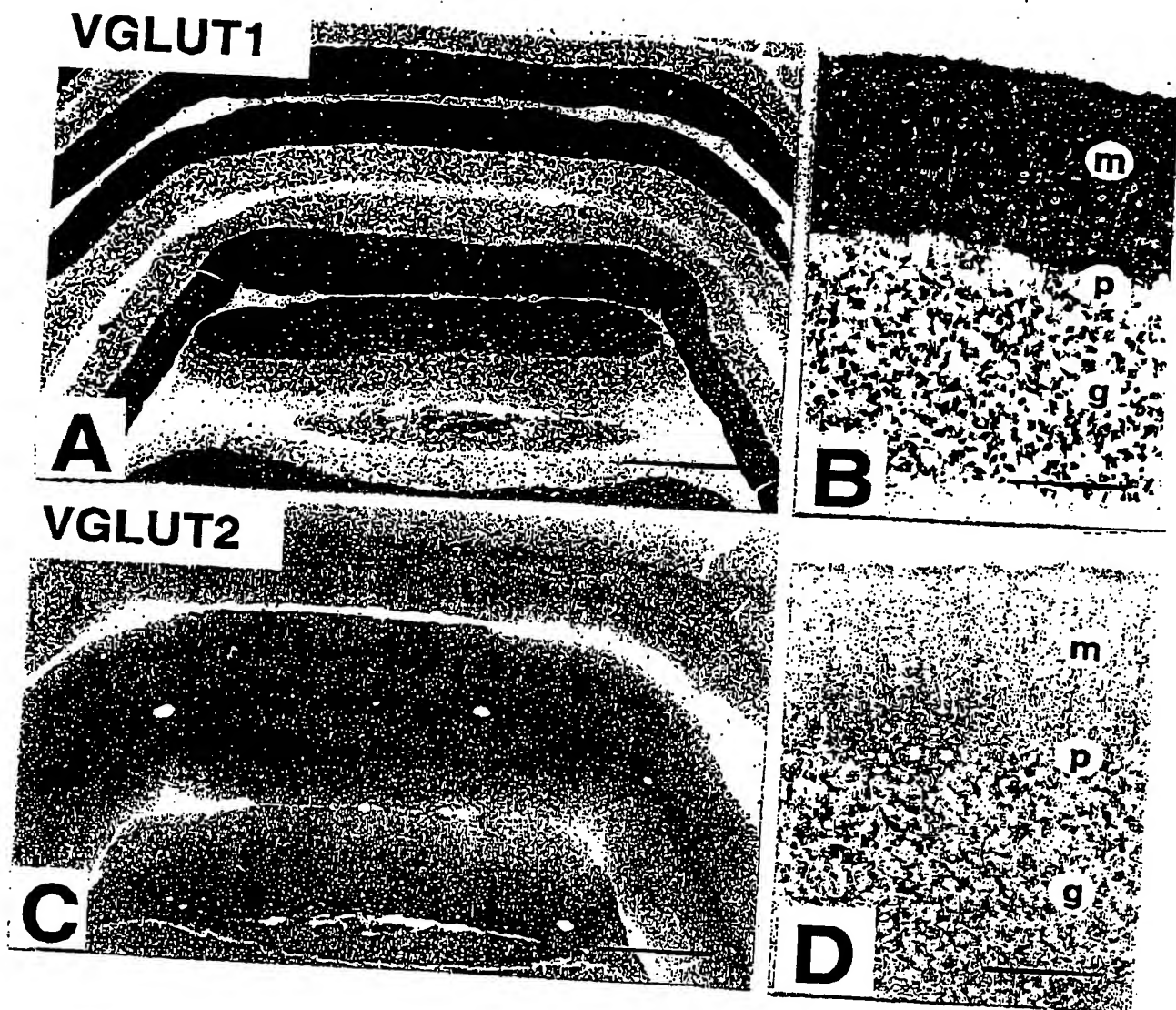
~~171~~

Fig 18/



Wm

Fig 19)



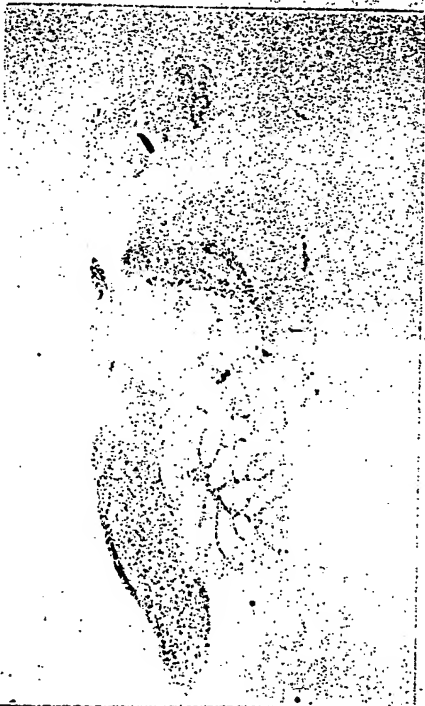
dm

Fig 201

AS

sense

BNPI



DNPI



FIG 21)

